

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

PATRONS DE DÉVELOPPEMENT DE L'ENDOSQUELETTE
(CHONDRIFICATION ET MINÉRALISATION) CHEZ DEUX ESPÈCES DE
CHONDRICHTHYENS ACTUELS : PERSPECTIVES ÉVO-DÉVO DES
GNATHOSTOMES

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
CYRENA RILEY

JANVIER 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Un doctorat, c'est une réussite personnelle mais aussi un travail d'équipe. Richard Cloutier, mon directeur de thèse, a fait preuve d'une confiance et d'un optimisme en prenant la chance de m'accepter que moi-même je n'aurai eu. Je le remercie donc pour cet égard d'esprit temporaire ou éclair de génie, c'est selon. Richard, tu as été le directeur qu'il me fallait pour passer à travers cette étape de vie. Merci de ton soutien, de ta patience et de ta compréhension. Merci pour m'avoir appris la patience de faire de la science correctement, de ne pas avoir peur d'oser, pour ta croyance que tout est possible et pour ton sourire.

I would like to thank Eileen Grogan, my co-director, for having accepted Richard's offer on this venture. Communication was not always easy, but you have made me a better scientist. Thank you for introducing me to chimaeras, de Beer and Kemp and Westrin. Thank you for your comments and advice. Thank you Richard Lund for great food and great conversation, and for bringing joy in the study of the very dead. Thank you to all the students of the Grogan-Lund lab.

Je remercie particulièrement Laurence Fischer-Rousseau, Daniel Potvin-Leduc et Marion Chevrinais pour leur précieuse aide et encouragements. Je remercie également tous les autres membres de mon laboratoire pour leur aide et leur soutien moral et technique : Élodie Libert, Olivier Larouche, Catherine Morel, France Charest, Émilie Lebel, Vincent Roy et Isabelle Béchard.

D'un côté plus personnel, Je remercie ma mère, Lucille MacMitchell Riley, de ses encouragements et de son aide indéfectible ; Je n'aurai pas réussi à terminer ce doctorat sans son précieux soutien. Je désire également remercier Pierre-Marc Chouinard pour son soutien moral qui a été essentiel, ainsi qu'à tous mes amis, sans qui ce doctorat aurait été beaucoup plus difficile. Merci à Isabelle Béchard de m'avoir encouragée à rencontrer Richard Cloutier, et à Isabelle et Jean-Marc Phillion pour leur aide et encouragements.

Merci à tous.

“When you marooned me on that god forsaken spit of land, you forgot one very important thing, mate: I’m Captain Jack Sparrow”

Captain Jack Sparrow

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ANNEXES.....	xv
RÉSUMÉ.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	
1.1 La problématique	1
1.1.1 L'utilisation des séquences développementales de gnathostomes basaux en Évo-Dévo.....	1
1.1.2 L'état de la question et le problème à résoudre qui en découle	5
1.2 Sujet de recherche	26
1.3 Objectifs généraux et hypothèses de recherche	60
1.3.1 Choix des espèces.....	60
1.3.2 Objectifs et hypothèses de recherche	62
1.4 Méthodologie	66
1.4.1 Matériel	66
1.4.2 Méthodes - Procédures générales.....	68
1.4.3 Double coloration.....	69
1.4.4 Séries ontogénétiques.....	71
1.4.5 Prise et analyse de données	73
1.4.6 Nomenclature	76
1.5 Plan de la thèse	77

CHAPITRE II	
CHIMAERID PAIRED FIN PATTERNING : SERIAL HOMOLOGUES AND MODULES	
2.1	Introduction..... 83
2.2	Material and Methods 90
2.3	Results..... 92
2.4	Discussion 109
2.5	Conclusion 122
CHAPITRE III	
FORMATION OF THE OCCIPITAL REGION AND SYNARCUUM IN THE CHIMAERID <i>CALLORHINCHUS MILII</i>	
3.1	Introduction..... 127
3.2	Materiel and Methods 133
3.3	Results..... 135
3.4	Discussion 144
3.5	Conclusion 157
CHAPITRE IV	
ONTOGENETIC PROGRESSION OF MINERALIZATION IN AN ELASMOBRANCH, THE THORNY SKATE (<i>AMBLYRAJA RADIATA</i>)	
4.1	Introduction..... 162
4.2	Material and Methods 164
4.3	Results..... 170
4.4	Discussion..... 189
4.5	Conclusion 205
CHAPITRE V	
CONCLUSION GÉNÉRALE	
5.1	Contexte, originalité de l'étude et rappel des objectifs..... 207
5.1.1	Contexte 207
5.1.2	Originalité de l'étude..... 209
5.1.3	Rappel des objectifs 212
5.2	Principaux résultats..... 214
5.2.1	Description de la morphologie et du développement morphologique des nageoires paires chez <i>Callorhinchus milii</i> 214

5.2.2	Description de la morphologie et du développement morphologique de la région occipitale et du synarcuum chez <i>Callorhinchus milii</i>	219
5.2.3	Description de la progression ontogénétique de la minéralisation (aréolaire, tessérale) de l'endosquelette complet chez <i>Amblyraja radiata</i>	223
5.3	Portée de l'étude	229
5.4	Limitations de l'étude	233
5.4.1	Conditions inférées à partir d'un nombre d'espèces limitées	233
5.4.2	Problèmes liés à la condition et au nombre de spécimens	234
5.4.3	Problèmes liés à l'utilisation d'un proxy de maturité	236
5.5	Perspectives	238
5.5.1	La minéralisation chez les espèces actuelles et fossiles de chondrichthyens	238
5.5.2	Avenues de recherche sur la minéralisation des chondrichthyens	239
5.5.3	Conclusion : vers une synthèse intégrative du développement des chondrichthyens	240
ANNEXE		242
BIBLIOGRAPHIE.....		249

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
CHAPITRE II	
Table 2.1. Stage, ANSP catalog number, total length (mm) and sex of <i>C. milii</i> specimens.	91
CHAPITRE III	
Table 3.1. Stages, ANSP catalog number, total length (mm) and conditions of <i>C. milii</i> specimens.	134
CHAPITRE IV	
Table 4.1. Descriptive information for <i>A. radiata</i> specimens. The developmental stage (early or late embryo, early or late juvenile), number of mineralized structures, specimen number, disc width, total length and sex of each specimen are given. The developmental stage was ascertained according to the number of mineralized structure and general state of development.	166
Table 4.2. Summary of mineralization directions within morphological systems of chondrichthyan and actinopterygian fishes. Abbreviations: anatomy: C = centra, Na = neural arch, Ha = haemal arch, Hyp = hypural, Rad = radial; directions: A-P = antero-posterior, B1= bidirectionnal 1 (mineralization begins first in the middle elements and proceeds to the extremities), B2 = bidirectionnal 2 (C3 and C4 mineralize first, followed by C2 and C1 postero-anteriorly and C5 onward antero-posteriorly), B3 = bidirectionnal 3 (mineralization proceeds from the extremities to the middle), B4 = bidirectionnal 4 (mineralization begins anteriorly and in middle then proceeds to extremities), B5 = mineralization begins in the middle of the ceratohyal, then proceeds to extremities, D-P = disto-proximal, Multi = multiple origins and directions of mineralization, NA = not available, NP = not present, P-A = postero-anterior, P-D = proximo-distal, Rad D-V = radials mineralize following a dorso-ventral direction, Rad Mid-Ext. = middle radials mineralize first followed by those located at the extremities, Simult = elements mineralize simultaneously, Und = direction of mineralization remained undetermined. Sources: 1) Ahlstrom and Counts (1958); 2) Balart (1995); 3) Bartsch and Gemballa (1992); 4) Bensimon-Brito <i>et al.</i> (2012); 5) Benzer (1944); 6)	

Bird and Mabee (2003); 7) Brown *et al.* (2001); 8) Campinho *et al.* (2004); 9) Cardeira *et al.* (2012); 10) Claeson (2011); 11) Cloutier *et al.* (2010); 12) Crane (1966); 13) Cubbage and Mabee (1996); 14) Cuervo *et al.* (2012); 15) Darias *et al.* (2010); 16) Eames *et al.* (2007); 17) Faustino and Powers (1998); 18) Faustino and Powers (1999); 19) Faustino and Powers (2001); 20) Fischer-Rousseau *et al.* (2009); 21) Fraser *et al.* (2004); 22) Grande (2010); 23) Grande and Bemis (1998); 24) Grünbaum *et al.* (2003); 25) Grünbaum *et al.* (2012); 26) Gwyn (1940); 27) Houde *et al.* (1974); 28) Imamura and Yabe (1998); 29) Itawaza (1963); 30) Johanson *et al.* (2013); 31) Koumoudouros *et al.* (2001); 32) Koumoudouros *et al.* (2001); 33) Kužir *et al.* (2009); 34) Lau and Shaftland (1982); 35) Leiby (1979); 36) Lewis and Lall (2006); 37) Liu (2001); 38) Mabee (1993); 39) Mabee and Noordsy (2004); 40) Matsuoka (1997); 41) Matsuura and Suzuki (2000); 42) Mook (1977); 43) Moser and Ahlstrom (1970); 44) Omori *et al.* (1996); 45) Ott *et al.* (2012); 46) Pavlov and Moksness (1997); 47) Potthoff (1975); 48) Potthoff (1980); 49) Potthoff *et al.* (1980); 50) Potthoff and Kelley (1982); 51) Potthoff *et al.* (1986); 52) Potthoff *et al.* (1987); 53) Potthoff *et al.* (1988); 54) Potthoff and Tellock (1993); 55) Richards *et al.* (1974); 56) Riley *et al.* present study; 57) Roo *et al.* (2010); 58) Schaefer and Summers (2005); 59) Sfakianakis *et al.* (2004); 60) Sfakianakis *et al.* (2005); 61) Summers *et al.* (2004); 62) Tong *et al.* (2012); 63) Velez *et al.* (2003); 64) Watson (1987); 65) Watson and Walker (1992); 66) Weisel (1967); Wollom (1970).

.....197

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
FIGURES - CHAPITRE 1	
Figure 1.1. Phylogénie moléculaire, démontrant les relations entre les différentes familles de chondrichthyens (requins, raies et chimères) et leur temps de divergence approximatif. Abréviations : C (Carbonifère), CZ (Cénozoïque), D (Dévonien), J (Jurassique), K (Crétacé), O (Ordovicien), P (Permien), Pg (Paléogène), S (Silurien), Tr (Trias). Figure tirée de Heinicke <i>et al.</i> (2009).	28
Figure 1.2. Phylogénie moléculaire illustrant les temps de divergence entre les requins (Selachii), raies (Batoidea) et chimères (Holocephali). Figure tirée de Inoue <i>et al.</i> (2010).	30
Figure 1.3. Schéma d'un squelette de requin démontrant la distribution de la minéralisation composée de tesserae (vert) et de cartilage aréolaire (orange). A. Minéralisation aréolaire (AC) présente dans le centrum seulement ; les vertèbres sont formées des trois types de minéralisation : aréolaire (AC), globulaire (GC) et prismatique (PC). B. Minéralisation prismatique (pris calc) située sous le périchondrium (peri chon). C. Minéralisation globulaire (glob calc) située près de la matrice cartilagineuse (ecm) ; on peut voir les chondrocytes dans leur cavité (lac) et les lignes de Liesegang (lies line). Figure tirée de Dean et Summers (2006).....	41
Figure 1.4. Schématisation de cartilage d'élasmodont non-minéralisé et minéralisé (à droite), basée sur une coupe provenant de la mâchoire inférieure de la raie <i>Urolophus halleri</i> (en haut, à gauche). Les tesserae (en bas, à gauche) sont des blocs constitués de minéralisation prismatique (PC) et de minéralisation globulaire (GC), coincés entre le périchondrium fibreux et la matrice de cartilage non minéralisé. Figure tirée de Dean et Summers (2006).....	44
Figure 1.5. Chimère-éléphant <i>Callorhynchus milii</i> (femelle adulte). Barre d'échelle : environ 10 cm. Crédit photographique : Aquarium de Melbourne, Australie.	61
Figure 1.6. Raie épineuse <i>Amblyraja radiata</i> (femelle juvénile). Barre d'échelle : environ 1 cm. Crédit photographique : C. Riley.	62

FIGURES –CHAPITRE II

Figure 2.1. Order and direction of chondrification of basal and radial elements in *C. milii* paired fins. A-D, pectoral fins; E-H pelvic fins. A. specimen ANSP 174661, stage 31. B. ANSP 174688, stage 32. C. ANSP 174691, stage 33. D. Pectoral fin of ANSP 174675, stage 36. E. ANSP 174688, stage 32. F. ANSP 174682, stage 33. G. ANSP 174692, stage 34. H. Pelvic fin of ANSP 174675, stage 36. ACC: anterior clasper cartilage; AR: anterior radial element; Basi C: basipterygial complex; Basi P: basipterygial process; DR: distal radials; Meta C: metapterygial complex; Meta S: metapterygial segments; MR: middle radials; PCC: posterior clasper cartilage; PR: proximal radials; Pro: propterygium. All specimens are cleared and stained; cartilages are stained in blue. Scale bar: 1mm. 95

Figure 2.2. Configuration of coracoid, propterygium and metapterygium during different developmental stages of *C. milii*. A. ANSP 174693, stage 31. B. ANSP 174696, stage 32. C. ANSP 174682, stage 33. D. ANSP 174663, stage 35. Cor: coracoid; Meta: metapterygium; Meta C: metapterygial complex; Meta P: metapterygial process; Meta S: metapterygial segment; Pro: propterygium. Scale bar: 1mm.98

Figure 2.3. Diagram illustrating concordant elements of A. pectoral and B. pelvic fins of *C. milii* specimen ANSP 174675, stage 36. Similar elements are color-coordinated between paired fins. Arrows illustrate the direction of chondrification of basal and radial elements.108

Figures 2.4. Vertebrate phylogeny showing paired fins condition, evolutionary events and modules. Relationships are illustrated using a general phylogenetic framework reconstructed based on Trinajstić *et al.* (2014), Pradel *et al.* (2010), Grogan and Lund (2009) and Zhu and Yu (2009). Two alternatives of chondrichthyan relationships are illustrated: A = Grogan and Lund (2009), B = Pradel *et al.* (2010). A-P patterning: antero-posterior appendage patterning; D-A module = dorsal + anal fin patterning module (Mabee *et al.*, 2002), E-E module = exoskeleton-endoskeleton module (Mabee *et al.*, 2002), FDF = first dorsal fin module (Mabee *et al.*, 2002); Pectoral fin cart. disc = pectoral fin cartilaginous disc. Crown gnathostomes are in bold, taxon marked with a cross are extinct and with “ ” are hypothesized as paraphyletic.....122

FIGURES - CHAPITRE III

Figure 3.1. Synarcuum of *C. milii*. Drawing (B) made from picture (A) of newly hatch cleared-and-stained specimen ANSP 174713, left side; stippled lines are elements that are unclear due to the specimen being cut longitudinally. BD, basidorsal; DFAC, first dorsal fin attachment cartilage; DSF, dorsal synarcual

spinal nerve foramen; LES, lateral extension of synarcuum; N, notochord; NA, neural hemiarch; SP, synarcuum plate; VSF, ventral synarcual spinal nerve foramen. Scale bar = 1mm.132

Figure 3.2. Occipital region and synarcuum of embryonic and newly hatch specimens of ontogenetic series of *C. milii*. Original photograph on left column; drawing from the photograph on the right; only relevant structures are illustrated. Occipital and spinal nerve abbreviations are in smaller font. All specimens are in lateral view. **A.** Stage 30 (ANSP 174667). **B.** Stage 31 (ANSP 174661). **C.** Stage 34 (ANSP 174712). **D.** Stage newly hatched (ANSP 174713), right side without synarcuum plate; left side with synarcuum plate illustrated in Figure 3.1. ABC, anterior basicapsular commissure; AOC, anterior otic cartilage; AVCS, anterior ventral cartilage of synarcuum; b, foramen of spinal nerve b; BD, basidorsal; BV, basiventral; c, foramen of spinal nerve c; da, dorsal foramen of spinal nerve a; DFAC, first dorsal fin attachment cartilage; DSF, dorsal synarcual spinal neural foramen; IX, foramen of glossopharyngeal nerve; LES, lateral extension of synarcuum; N, notochord; NA, neural hemiarch; OA, occipital arch; OC, otic capsule; P, parachordal; PBC, posterior basicapsular commissure; POC, posterior otic cartilage; SCA, scapula; SNA, synarcuum neural hemiarch; SP, synarcuum plate; va, ventral foramen of nerve a; VSF, ventral synarcual foramen; X, foramina of vagal nerve; y, foramen of occipital nerve y; z, foramen of occipital nerve z. Scale bar = 1mm.138

Figure 3.3. Phylogenetic synthesis illustrating the number of occipital and synarcua foramina and morphology of postcranial vertebrae present in chondrichthyans. Cladogram taken from Heinicke *et al.* (2009). Legend on the diagram. Species are listed with the bibliographic source given in parentheses. Sharks: *Carcharodon carcharias* (Gardiner *et al.*, 2012); *Chlamydoselachus* (Hawkes, 1906); *Etmopterus spinax* (Holmgren, 1940); *Galeus melanostomus* (de Beer, 1937); *Heterodontus francisci* (Daniel, 1914); *H. japonicus* (Holmgren, 1940); *H. philippi* (de Beer, 1937); *H. griseus* (Daniel, 1934); *Lamna nasus* (Garman, 1913); *Notorynchus cepedianus* (Daniel, 1934); *Orectolobus* (Claeson et Hilger, 2011); *Pristiophorus* (Claeson et Hilger, 2011); *Scyliorhinus canicula* (de Beer, 1937); *Somniosus* (Hawkes, 1906); *Sphyrna* (Claeson et Hilger, 2011); *Squalus acanthias* (Daniel, 1914 ; de Beer, 1937 ; El-Toubi, 1949 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971); *Squatina dumeril* (Claeson et Hilger, 2011); *S. guggenheim* (Claeson et Hilger, 2011); *S. japonica* (Claeson et Hilger, 2011); *S. punctata* (Claeson et Hilger, 2011); *S. squatina* (Claeson et Hilger, 2011). Batoids: all batoids have a synarcuum, Myliobatiformes have two synarcua (Compagno, 1999). *Amblyraja radiata* (Claeson, 2011); *Dipturus menni* (Moreira, Gomes et de Carvalho, 2011); *Himantura signifer* (Compagno et Roberts, 1982); *H. krempfi* (Compagno et Roberts, 1982); *Malacoraja senta* (Claeson, 2011); *Pristis microdon* (Garman, 1913); *Raja inornata* (Claeson, 2011);

R. ocellata (McEachran et Martin, 1978); *Torpedo ocellata* (Holmgren, 1940); *T. marmorata* (de Beer, 1937); *Urotrygon daviesi* (Nishida, 1990); *Urolophus halleri* (Compagno et Roberts, 1982 ; Holmgren, 1940). Holocephali: all extant chimaeras have a synarcua (Didier, 1995 ; Stahl, 1967): *Callorhinchus antarticus* (Schauinsland, 1903); *C. milii* (Didier, 1995; this study); *Chimaera monstrosa* (Johanson *et al.*, 2013); *Hydrolagus colliei* (Ma *et al.*, 2010).151

FIGURES - CHAPITRE IV

Figure 4.1. Skeletal anatomy of an *A. radiata* juvenile. Several structures (dorsal view: right pectoral fin, left pelvic fin, left branchial arches, left and right ceratobranchial 5; ventral view: both pectoral and pelvic fins, right side branchial rays, dorsal fins) and the posterior region of the vertebral column were omitted in order to enhance clarity. Centra were shaded darker in order to distinguish them from other vertebral elements. Fin basals were shaded darker in order to distinguish them from radials. List of abbreviations: ac = auditory capsule, af = anterior fontanelle, ao = antorbital cartilage, bc = basibranchial copula, bh = basihyal, br = branchial rays, bs = basals, bt = basiptyergium, bts = basiptyergial segment, cb = ceratobranchials, cb5 = ceratobranchials 5, com = compound radial, cor = coracoid bar, c-ph = ceratopseudohyal, cs = clasper, ct = centra, dr = distal radial, ds = distal segment, eb = epibranchials, e-ph = epipseudohyal, ha = heamal arch, hb2 = hypobranchial 2, hb3+4 = compound hypobranchial 3+4, hm = hyomandibula, h-ph = hypopseudohyal, hs = heamal spine, is1-2 = intermediary segment 1-2, int = interdorsals, ja = jugal arches, lip = lip of synarcuum, ls = lateral stay, mc = median crest, mds = middle segment, mk = Meckel's cartilage, mr = middle radial, ms = mesopterygium, mt = metapterygium, mts = metapterygial, na = neural arche, nc = nasal capsules, ns = neural spine, oc = occipital condyles, occ = otic capsule, oct = occipital cotyle, pa = pectoral arch, pb = pharyngobranchials, pb4+eb5 = compound pharyngobranchial 4+epibranchial 5, pf = posterior fontanelle, ph = pseudohyal arch, po = propterygium, pq = palatoquadrate, pr = proximal radial, ps = proximal segment, pub = pubioischadic bar, ra = rostral appendix, rb = rib, rs = rostral shaft, sc = spiracular cartilage, scp = scapular process.167

Figure 4.2. Linear regression of log-transformed total length ($\text{Log}_{10} L_T$) and log-transformed disc width ($\text{Log}_{10} D_w$) ($N = 22$; $R^2 = 0.9022$) of the *A. radiata* specimens.171

Figure 4.3. Relation between the number of mineralization events and disk width (cm) in *A. radiata* specimens ($r_p = 0.91009$; $P = 4.28 \times 10^{-9}$).....172

Figure 4.4. Morphology of the different patterns of mineralization in *A. radiata*. A. Specimen of *A. radiata*, with boxes showing the location of the featured patterns of tesserate mineralization. B. Typical morphology of the catenated pattern of tesserate

mineralization (pectoral fin radials). C. Intermediate pattern of tesserate mineralization indicated by arrow at left and a purported catenated pattern by arrow at right (pelvic fin distal radials); Int. = intermediate of tesserate mineralization, Cat. = catenated pattern of tesserate mineralization. D. Typical morphology of the crustal pattern of tesserate mineralization (pelvic fin proximal radials). 174

Figure 4.5. Sequence of mineralization for the elements within each morphological systems for wild-caught *A. radiata* according to disc width rank. An X precises the first presence of mineralization observed within a specimen, whereas a solid bar marks the disc width at which all subsequent specimens possess that element mineralized. Disc width in pale grey box indicates embryos, dark grey indicates juveniles. Blue is for cartilage, purple for aerolar mineralization, red for a crustal pattern of tesserate mineralization, and pink for a catenated pattern of tesserate mineralization..... 177

Figure 4.6. Cartilaginous and mineralized endoskeleton of *A. radiata* and directions of mineralization within the most advanced state of embryo and juvenile specimens. The type of mineralization is indicated by the color of the endoskeletal structures. Arrows indicate the direction of mineralization, whereas color of arrows indicates the type of mineralization. PD = proximo-distal direction. Blue is for cartilage purple for aerolar mineralization, red for a crustal pattern of tesserate mineralization, and pink for a catenated pattern of tesserate mineralization. 182

LISTE DES ANNEXES

Annexe	Page
Appendix A. Supplementary information on the order of skeletal ossification in actinopterygians	235

RÉSUMÉ

La biologie évolutive du développement (Évo-Dévo) propose une approche dynamique dans la solution des questions évolutives, en étudiant les mécanismes développementaux apportant des changements au niveau du phénotype d'un organisme. C'est dans un contexte Évo-Dévo que certaines études requièrent l'utilisation de jeunes stades développementaux provenant d'organismes modèles, organisés en une séquence d'âges croissants afin de voir la progression du développement au cours de l'ontogénie. Ces séquences développementales sont devenues des outils importants afin de décrire et comparer l'ontogénie de différentes espèces et déterminer les changements produits au cours de cette période, et mieux comprendre comment ces changements ont affecté leur évolution. Ces comparaisons permettent, entre-autres, de déterminer une condition basale (plésiomorphe) en comparant la condition présente chez un groupe phylogénétiquement basale, comme les chondrichthyens (requins, raies, chimères) à celle plus dérivée des ostéichthyens (poissons osseux). Les séquences développementales sur la progression de la mise en place des éléments endosquelettiques et leur minéralisation ont été étudiées intensément chez les ostéichthyens, mais aucune description de séquence complète n'est disponible pour les chondrichthyens. Cette situation est regrettable, car elle rend difficile la polarisation des conditions observées chez les ostéichthyens. De plus, l'analyse de séquences de chondrification et de minéralisation permettrait une compréhension accrue dans la formation et l'évolution de systèmes morphologiques, tels les nageoires paires. Aussi, la présence (ou l'absence) d'homologie entre des systèmes morphologiques présents chez les chondrichthyens ont été établies sans l'utilisation du critère ontogénétique ; pourtant la similarité de développement constitue un facteur important dans la reconnaissance objective d'homologie. La description et l'analyse de la progression de la chondrification et de la minéralisation chez deux espèces de chondrichthyens sont l'objectif de cette thèse.

Le premier volet avait pour objectif, en étudiant l'ordre et la mise en place des éléments cartilagineux chez un chondrichthyen, la chimère-éléphant (*Callorhinchus milii*), de valider la condition d'homologie sériée des nageoires paires, et de comparer la progression de la chondrification des nageoires paires entre les chondrichthyens et avec les ostéichthyens. Les résultats de cette étude sont les premiers à démontrer chez la chimère-éléphant que : (1) l'ordre et la direction de mise en place des éléments cartilagineux sont similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes, supportant leur statut d'homologues sériés ;

(2) la grande similitude morphologique et développementale entre ces nageoires suggère la présence de modules morphologiques et développementaux issus d'une duplication ; (3) le développement des nageoires paires est généralement similaire chez les chondrichthyens et (4) les conditions basales chez les gnathostomes vivants actuels incluent la présence de modules au niveau des nageoires paires, d'une direction de développement proximo-distale et la formation des nageoires pectorales avant les pelviennes. Ainsi, les stades ontogénétiques représentent une importante source d'informations morphologiques non décelées chez le phénotype adulte, et doivent être incorporés dans l'étude des conditions plésiomorphes des gnathostomes actuels.

Le deuxième volet avait pour objectif, en étudiant l'ordre et la mise en place des éléments cartilagineux chez un chondrichthyen, la chimère-éléphant (*C. milii*), de vérifier la présence d'homologie entre la région occipitale du chondrocrâne et la région antérieure de la colonne vertébrale, de vérifier si la composition (éléments vertébraux) incorporés dans la région occipitale des chondrichthyens étaient homologues, et si les synarcua des raies et des chimères étaient homologues. Cette étude a révélé que (1) la formation de la région occipitale et antérieure de la colonne vertébrale différaient au cours de leur développement ; (2) que la composition (éléments vertébraux) de la région occipitale des chondrichthyens n'est pas homologue entre les différentes espèces et (3) que les synarcua des chimères et des raies ne sont pas homologues. Cette étude utilise, pour la première fois, le critère ontogénétique dans l'attribution de non-homologie de la région occipitale et la région antérieure de la colonne vertébrale, et entre les synarcua de chondrichthyens.

Le troisième volet avait pour objectif, en décrivant la minéralisation chez un chondrichthyen, la raie épineuse (*Amblyraja radiata*), de comparer sa progression de minéralisation à celle présente chez d'autres chondrichthyens et ostéichthyens afin d'établir des tendances générales de la minéralisation. L'ordre, les patrons et les directions de minéralisation sont décrits pour la première fois chez un chondrichthyen. L'ordre et les directions de minéralisation sont similaires chez les chondrichthyens, et certaines tendances évolutives sont inférées pour les gnathostomes actuels. Un ensemble de contraintes phylogénétiques et mécaniques sont à l'origine de ces tendances.

Mots-clefs :

Chimère-éléphant, raie épineuse, *Callorhinchus milii*, *Amblyraja radiata*, ontogénie, chondrification, minéralisation, nageoires paires, tesserae, minéralisation aréolaire

ABSTRACT

Evolutionary developmental biology (Evo-Devo) proposes a dynamic approach in solving evolutionary questions, by studying the developmental mechanisms causing changes at the phenotypic level of the organism. It is within this Evo-Devo context that certain studies require the use of early developmental stages from model organisms, organized in sequences of increasing age in order to see the progression of development during ontogeny. These developmental sequences have become important tools in order to describe and compare the ontogeny of different species and determine changes occurring during this period, and how these changes have affected their evolution. These comparisons allow, among other things, to determine a basal (plesiomorphic) condition by comparing a phylogenetically basal group, such as chondrichthyans (sharks, skates and chimaerids) to the more derived one of osteichthyans. Furthermore, the analysis of chondrification and mineralization sequences would allow a better understanding of the formation and evolution of morphological systems, such as paired fins. Also, the presence (or absence) of homology between morphological systems observed in chondrichthyans has been established without the use of the ontogenetic criteria; however, similarity in development represents an important factor in the objective recognition of homology. The description and analysis of the progress of chondrification and mineralization in two chondrichthyan species are the main objectives of this thesis.

The purpose of the first section was, by studying the order and the patterning of the cartilaginous elements in a chondrichthyan, the elephant-shark (*Callorhinchus milii*), to validate the serial homologue status of paired fins, and to compare the progression of the chondrification of paired fins among chondrichthyans, and with osteichthyans. The results of this study are the first to demonstrate in the elephant-shark that: (1) the order and the patterning direction of the cartilaginous elements are similar between the pectoral and pelvic fins, supporting their status as serial homologues; (2) the high morphological and developmental similarity between these fins suggests the presence of morphological and developmental modules resulting from a duplication; (3) paired fins development is generally similar in chondrichthyans and (4) the basal condition for extant gnathostomes includes the presence of paired fin modules, of a proximo-distal direction of formation and the formation of pectoral before pelvic fins. Thus, ontogenetic stages represent an

important source of morphological information undetected in the adult phenotype, and must be incorporated in the study of plesiomorphic vs apomorphic conditions in extant gnathostomes.

The purpose of the second section was, by studying the order and patterning of the cartilaginous elements in a chondrichthyan, the elephant-shark (*Callorhinchus milii*), to verify the presence of homology between the occipital region of the chondrocranium and the anterior region of the vertebral column, to verify if the vertebral elements incorporated in the occipital region of chondrichthyans are homologous, and if the synarcua of batoids and chimaerids are homologous. This study has revealed that: (1) the formation of the occipital region and of the anterior region of the vertebral column differ during their development; (2) the composition (vertebral elements) of the occipital region of chondrichthyans is not homologous among species; (3) the batoid and chimaera synarcua are not homologous. This study uses, for the first time, the ontogenetic criteria for the attribution of non-homology of the occipital region and the anterior region of the vertebral column, and between the synarcua of chondrichthyans.

The purpose of the last section was, by describing mineralization in a chondrichthyan, the thorny skate (*Amblyraja radiata*), to compare its progression of mineralization to the one present in other chondrichthyans. This was then compared to those observed in osteichthyans in order to establish general trends of mineralization. The order, patterns and directions of mineralization are described for the first time in a chondrichthyan. The order and direction of mineralization are similar in chondrichthyans in general, and specific trends in mineralization are inferred for extant gnathostomes. A combination of phylogenetic and mechanical constraints are at the origin of these trends.

Mots-clefs :

Elephant-shark, thorny skate, *Callorhinchus milii*, *Amblyraja radiata*, ontogeny, chondrification, mineralization, paired fins, tesseræ, areolar mineralization

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 La problématique

1.1.1 L'utilisation des séquences développementales de gnathostomes basaux en Évo-Dévo

Une récente approche est maintenant utilisée dans l'étude des mécanismes évolutifs, afin de refléter leur caractère dynamique : celle de la biologie évolutive du développement (Gilbert, 2003 ; Gilbert, Opitz et Raff, 1996 ; Robert, 2002). Cette discipline, aussi connue sous le terme "Évo-Dévo", étudie l'étroite relation présente entre le développement et l'évolution (Hall *et al.*, 2004 ; Hoekstral et Coyne, 2007) et comment les processus développementaux évoluent afin de produire, entre autres, de nouveaux patrons de développement et de nouvelles morphologies qui génèrent l'évolution phénotypique (Jenner et Wills, 2007). Les changements qui ont lieu au cours du développement d'un organisme peuvent agir (ou non) sur le phénotype et génotype et, possiblement, sur son évolution (Gilbert et Burian, 2003 ; Hall, 1999, 2002 ; Hall et Olson, 2003 ; Raff, 1996). Ceci résulte en un phénotype qui possède une forme et une fonction qui ne reflètent pas nécessairement une translation directe ou linéaire du génotype (Eble, 2004 ; Hall, 1999 ; Hall et Olson, 2003 ; Raff *et al.*, 1999 ; Robert, 2002 ; Schlichting

et Pigliucci, 1998 ; West-Eberhard, 2003), avec entre eux le développement comme lien explicatif (Hall, 1999, 2001, 2002, 2003a ; Hall et Olson, 2003). Le développement conditionne plusieurs aspects pendant l'ontogénie d'un organisme, incluant sa morphologie embryonnaire, larvaire, juvénile et adulte, et sa plasticité phénotypique (Hall, 1999). Les changements aux niveaux embryonnaires et larvaires vont produire des phénotypes transitoires ainsi que de nouveaux phénotypes, qui seront soumis aux pressions de la sélection naturelle (Arthur, 2003 ; Hall et Olson, 2003). La sélection naturelle affectera les stades embryonnaires et larvaires plus significativement que tout autre stade de développement (Adriaens et Verraes, 2002), ce qui rend l'analyse des séries ontogénétiques cruciales pour l'étude de l'évolution (Hernandez, Barresi et Devoto, 2002).

Une série ontogénétique est un groupe de spécimens placés en ordre croissant selon un proxy (taille, stade) spécifique, afin de reconstruire l'ontogénie typique à une espèce (Colbert et Rowe, 2008). Les séries ontogénétiques provenant d'espèces qui ont une position phylogénétique basale chez les gnathostomes, tels les chondrichthyens (requins, raies et chimères), sont analysées et comparées afin de répondre à des quêtes importantes de l'Évo-Dévo: la caractérisation de modules (moléculaires, développementaux, morphologiques) (Young et Hallgrímsson, 2005), leur trajectoire évolutive (Schulmeister et Wheeler, 2004 ; Vogt *et al.*, 2013) et l'identification des conditions plésiomorphes (ancestrales) des gnathostomes (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Mabee *et al.*, 2002).

Les membres paires sont un exemple de modules moléculaires, développementaux et morphologiques (Raff, 1996 ; Young et Hallgrímsson, 2005 ; Winther, 2001). Bien que l'évolution des nageoires paires en membres pairs de tétrapodes a été très étudiée, certaines questions persistent, tel le mécanisme expliquant

l'apparition des nageoires pelviennes (Cole et Curie, 2007). La thèse de la duplication est celle présentement favorisée, où les nageoires pelviennes seraient le résultat d'une duplication des mécanismes moléculaires présents dans les nageoires pectorales, réitérés postérieurement (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Ceci ferait des nageoires paires des homologues sériés ; or bien qu'acceptée, cette théorie de duplication est surtout appuyée par des preuves moléculaires provenant des nageoires paires des chondrichthyens (Freitas, Zhang et Cohn, 2007), car très peu d'études morphologiques se sont concentrées sur le développement des nageoires des chondrichthyens.

La région occipitale du chondrocrâne des chondrichthyens est une autre région où l'homologie de certaines constituantes a été suggérée, mais sans être testée (Britz et Johnson, 2010). Aussi, la région occipitale et la région antérieure de la colonne vertébrale, bien que provenant de sclérotomes homologues sériés, possèdent une morphologie adulte très différente (Johanson, Carr et Ritchie, 2010). Bien que la morphologie adulte diffère entre ces régions, il est cependant possible que la morphologie de leurs premiers stades de développement soit très similaire, puisque les éléments squelettiques sont formés à partir de sclérotomes sériés ; cependant cette ressemblance développementale n'a jamais été démontrée. La partie antérieure de la colonne vertébrale des raies et chimères se transforme au cours du développement en une structure appelée synarcuum. Ces synarcua sont considérés comme non-homologues entre les deux groupes, basé sur la comparaison de leur morphologie adulte (Johanson *et al.*, 2013) ; cependant, le critère ontogénétique est important dans la reconnaissance d'homologie (Raff, 1999) et donc leur développement devrait être comparé afin d'infirmier ou réfuter cette hypothèse de non-homologie.

Cette comparaison ne peut être effectuée à cause du manque de données sur les séquences développementales des chondrichthyens. Celle-ci rend difficile la

polarisation des caractères phylogénétiques présents chez les ostéichthyens (Mabee *et al.*, 2002). Ainsi, le peu d'information sur la progression de la chondrification et de la minéralisation des chondrichthyens nuit à la résolution de questions évolutives, incluant celles mentionnées plus haut.

Les séquences développementales du squelette de deux espèces de chondrichthyens, la chimère-éléphant (*Callorhinchus milii*) et la raie épineuse (*Amblyraja radiata*), ont été analysées afin de combler cette lacune. La séquence de chondrification de la chimère-éléphant a été utilisée afin d'examiner deux systèmes morphologiques qui ont particulièrement été étudiés en Évo-Dévo : les nageoires paires (Mabee *et al.*, 2002 ; Yano et Tamura, 2013) et la colonne vertébrale (ten Broek *et al.*, 2012 ; Ward et Brainerd, 2007 ; Zhang, 2009). La séquence ontogénétique de la raie épineuse a été utilisée afin de caractériser la progression de deux types de minéralisation, uniques aux chondrichthyens, et de valider la présence de patrons communs entre la minéralisation des chondrichthyens et l'ossification des ostéichthyens (Cole et Currie, 2007 ; Mabee *et al.*, 2002).

Le sujet de cette recherche est donc la caractérisation des séquences de développement du squelette chez la chimère-éléphant afin de (1) vérifier la similarité morphologique et développementale entre les nageoires paires, de valider la présence de modules et de mieux comprendre la condition (monobasale ou polybasale) des nageoires paires ; (2) de comprendre la formation de la région occipitale et du synarcuum, tous deux représentant une régionalisation de la colonne vertébrale chez les raies et les chimères, et de valider leur homologie ; et chez la raie épineuse afin de (3) de comparer les séquences de minéralisation avec celles présentes chez d'autres espèces de chondrichthyens et chez les ostéichthyens.

1.1.2 L'état de la question et le problème à résoudre qui en découle

Importance de séquences développementales provenant d'espèces basales

Les études morphologiques comparatives utilisant des séquences développementales fournissent des informations clés à propos des patrons et des processus développementaux lorsque placés dans un cadre phylogénétique (Blomquist, 2009 ; Grünbaum, Cloutier et Dumont, 2003 ; Jeffery *et al.*, 2002 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Velhagen, 1997). Les changements s'effectuant au niveau des processus développementaux peuvent ensuite être identifiés comme la cause de diversité et de nouveautés morphologiques (Blomquist, 2009 ; Sommer, 2009).

L'utilisation d'une phylogénie adéquate permet aussi de retracer l'histoire évolutive des caractéristiques morphologiques et/ou développementales et la reconstruction de leur condition ancestrale (Janvier, 1996; Mabee, 2000). Cette reconstruction doit s'appuyer sur la reconnaissance de groupes externes (outgroups) ; selon l'interprétation la plus parcimonieuse, l'occurrence d'un caractère donné présent chez les groupes externes et le groupe dérivé infère sa présence dans leur dernier ancêtre commun. Les chondrichthyens, par exemple, occupent une position phylogénétique basale comparés aux ostéichthyens, et représentent le groupe externe le plus proche de ceux-ci (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Coolen *et al.*, 2007 ; Maissey, 1986 ; Schaeffer and Williams, 1977). Afin de comparer leurs conditions respectives, des séquences de développement peuvent être utilisées. Ces séquences sont inférées à partir de l'information recueillie d'un ensemble d'embryons, de larves et de juvéniles d'une espèce prédéterminée, qui sont placés en ordre de croissance afin de déterminer, par exemple, la direction dans laquelle les éléments morphologiques se forment (Smith, 2001).

La vaste majorité des séquences décrites concerne l'ossification chez les ostéichthyens (e.g., Cloutier *et al.*, 2010 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Mabee *et al.*, 2002). Il existe peu d'informations sur les séquences développementales des chondrichthyens, et ce, malgré leur utilisation en tant que sujet d'étude depuis les 200 dernières années (Didier, 1995 ; Gillis *et al.*, 2011 ; Wourms et Demski, 1993). Ce manque d'information est regrettable d'autant plus que leur endosquelette ne s'ossifie pas mais se minéralise en se couvrant de petites tuiles minéralisées, les tesserae, composées de cartilage globulaire et cartilage prismatique calcifié (Kemp et Westrin, 1979); ce mode de minéralisation représente une variation développementale des patrons de minéralisation des tissus endosquelettiques propres aux premiers gnathostomes et constitue une synapomorphie des chondrichthyens (Coates and Sequeira, 1998 ; Lund and Grogan, 1997 ; Maisy, 1984, 1986 ; Smith et Hall, 1990). Aucune séquence ontogénétique de minéralisation de l'endosquelette complète n'est disponible pour les chondrichthyens. Ceci a pour conséquences d'empêcher l'identification d'états plésiomorphes et les tendances phylogénétiques conservées (unissant des mécanismes développementaux qui apparaissent, à prime abord, diversifiés) ainsi que la caractérisation de modules phénotypiques (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Mabee, 2000 ; Mabee *et al.*, 2002).

Caractérisation de modules phénotypiques

Le concept de modularité est fondamental à la biologie évolutive et développementale, car il unit les approches développementales, moléculaires et évolutives (Mabee, 2006). La modularité représente un concept essentiel en Évo-Dévo (Mitteroecker et Bookstein, 2007) et est considérée par plusieurs chercheurs comme étant l'aspect le plus important affectant l'organisation d'un organisme (Bolker, 2000, 2005 ; Breuker, Debat et Klingenberg, 2006 ;

Klingenberg, Mebus et Auffray, 2003 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Raff et Raff, 2000 ; Raff, 1996 ; Von Dassow et Munro, 1999 ; West-Eberhard, 2003).

La modularité est une propriété biologique des organismes (Raff, 1996) ; ceux-ci sont interprétés en tant qu'entités construites de modules ou sous-unités (Gass et Bolker, 2003 ; Nelson, 2004 ; Schlosser et Thieffry, 2000). Les modules présents à tous les niveaux hiérarchiques partagent des caractéristiques communes comprenant plusieurs parties interactives qui sont (1) fonctionnellement intégrées (Goswami, 2007 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Poe, 2004), (2) partiellement indépendantes des autres modules (Bolker, 2000 ; Breuker, Debat et Klingenberg, 2006 ; Cheverud, 1996 ; Gass et Bolker, 2003 ; Goswami, Weisbecker et Sánchez-Villagra, 2009 ; Klingenberg, 2002 ; Schlosser, 2004 ; Schlosser et Thieffry, 2000 ; Wagner, 1996 ; Wagner, Pavlicev et Cheverud, 2007 ; West-Eberhard, 2003) et (3) capable de suivre des trajectoires évolutives qui sont indépendantes d'autres modules au même niveau dans une hiérarchie biologique (Bolker, 2000 ; Klingenberg, 2002 ; Mitteroecker et Bookstein, 2007 ; Von Dassow et Munro, 1999 ; Wagner, 1996 ; West-Eberhard, 2003).

La modularité augmente l'évolvabilité, qui est perçue comme la capacité d'une lignée à générer une variation phénotypique héritable, résultant de modifications des patrons développementaux (Hallgrímsson *et al.*, 2007 ; Wagner, Pavlicev et Cheverud, 2007). L'évolvabilité est favorisée par la capacité des modules à être réarrangés par dissociation, duplication, divergence ou co-option à des moments et des endroits différents, résultant en la génération de nouveaux phénotypes à tous les niveaux d'organisation (Breuker, Debat et Klingenberg, 2006 ; Gass et Bolker, 2003 ; Raff, 1996).

Une dissociation est observée lorsqu'un module performant une fonction spécifique à l'intérieur d'un système est relocalisé afin de performer une nouvelle

fonction, ou la même fonction dans un autre système (Raff et Raff, 2000). La duplication est observée lorsqu'un module est dupliqué et relocalisé (e.g., homologues sériés) (Young et Hallgrímsson, 2005) ; la duplication est un principe central de l'évolution (Weiss, 1990). La divergence se produit lorsqu'un module dupliqué performe une nouvelle fonction (Raff et Sly, 2000). Finalement, la co-option est observée quand un module est incorporé à l'intérieur d'un autre ou que sa fonction change (e.g., membre antérieur des tétrapodes se transformant en aile) (Raff, 1996). La modularité, sous l'action de ces quatre processus évolutifs, va promouvoir l'apparition de nouvelles adaptations pendant l'ontogénie (Mitteroecker et Bookstein, 2007). Celles-ci jouent un rôle important en rendant l'évolution du développement possible (Gass et Bolker, 2003 ; Raff, 1996).

Les modules développementaux peuvent être identifiés en tant qu'unités homologues dans des ontogénies comparables (Bolker, 2000 ; Gilbert et Bolker, 2001 ; Raff, 1996 ; Raff et Sly, 2000 ; Winther, 2001). Une homologie est définie comme une caractéristique partagée par deux organismes, due à leur descendance commune d'un même ancêtre, qui possédait cette caractéristique (Hall, 2003b ; Patterson, 1988 ; Wagner, 1989). Les modules homologues subiront des transformations au niveau de leur sous-unités ou des interactions entre celles-ci à travers le temps, résultant en changements évolutifs (Bolker, 2000 ; Raff, 1996 ; Redies et Puelles, 2001 ; Schlichting et Pigliucci, 1998).

La définition et la caractérisation de modules phénotypiques sont essentielles afin de comprendre le développement et l'évolution des structures morphologiques associées au phénotype d'un organisme (Klingenberg, Mebus et Auffray, 2003 ; Monteiro, Bonato et dos Reis, 2005). Un module, avec son intégration, sa cohésion et sa variation, est une hypothèse que l'on peut tester (Bolker, 2000 ; Magwene, 2001). De par ce fait, l'organisation des organismes en différents modules est devenu un sujet crucial pour l'étude de l'évolution morphologique

(Badyaev et Foresman, 2004 ; Klingenberg et Zaklan, 2000 ; Monteiro, Bonato et dos Reis, 2005). Un module moléculaire est un ensemble de gènes utilisés pour performer une fonction commune, et les réseaux moléculaires représentent les interactions entre les gènes et les modules (Rudel et Sommer, 2003). Un module morphologique est défini par un ensemble d'éléments qui sont délimités dans l'espace et interconnectés entre eux (Eble, 2004 ; Hartwell *et al.*, 1999 ; Lacquaniti *et al.*, 2013). Un module développemental est une partie d'un organisme en développement qui est autonome ou semi-autonome dans son patron de formation (Schlosser, 2004). Un module variationnel est constitué d'éléments qui varient ensemble et qui sont relativement indépendant d'autres éléments (Wagner et Altenberg, 1996 ; Wagner *et al.* 2007). Un module fonctionnel est un ensemble de traits intégrés entre eux servant une fonction commune, et qui peut être séparé d'autres unités semblable servant d'autres fonctions (Breuker *et al.* 2006). Finalement, un module évolutif est considéré comme une unité indépendante de changement évolutif (Gass et Bolker, 2003).

Les séquences développementales sont essentielles dans la caractérisation de modules, puisque (1) la modularité morphologique ou (2) la modularité morphologique et développementale peuvent être décrites en termes de la direction de formation d'éléments sériés (patterning) à l'intérieur de systèmes morphologiques (e.g., vertèbres de la colonne vertébrale) (Mabee *et al.*, 2002 ; Ward et Brainerd, 2007). Les séquences de chondrification et de minéralisation représentent l'ordre dans laquelle une série d'éléments endochondraux apparaissent sous forme cartilagineuse et s'ossifient subséquemment (Grünbaum, Cloutier et Dumont, 2003 ; Velhagen, 1997). Ces séquences sont décrites en termes de la première apparition d'un élément, du temps d'apparition d'un élément relatif aux autres à l'intérieur de systèmes morphologiques spécifiques, et finalement de la direction de chondrification et d'ossification de ces éléments à l'intérieur des systèmes morphologiques (Cloutier, 2010).

Les modules peuvent être caractérisés selon la similitude entre les séquences de formation d'éléments cartilagineux (chondrification) ou d'éléments minéralisés (ossification chez les poissons osseux) (Cloutier, 2010 ; Cubbage et Mabee, 1996). Les modules caractérisés par des séquences développementales devraient posséder des structures démontrant de l'intégration dans leur temps d'apparition au cours du développement (gardant leur même ordre d'apparition relatif aux autres) et dans le patron de la progression de la minéralisation malgré les différences dans les séquences avec les autres espèces en général (Goswami, 2007 ; Schlosser, 2001 ; Smith, 2001).

La formation et la séquence de développement des éléments sériés sont aussi des exemples de modularité. Les éléments sériés sont le produit de la duplication et de la dissociation de modules développementaux sériés à l'intérieur d'un organisme (Hall, 1995a ; Raff, 1996 ; Rieppel, 2005) et sont présents à travers le règne animal (Monteiro, 2008 ; Schlosser, 2004). L'évolution de structures homologues sériées peut être comprise en terme du redéploiement de modules en de nouveaux endroits (Allen, 2008 ; Hall, 1995a ; Rutishauser et Moline, 2005 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Ceci est aussi appelé homologie itérative, et homologie sériée dans le cas de caractères morphologiques (Mischler, 2003).

Les systèmes morphologiques possédant des éléments sériés sont des sujets prisés en Évo-Dévo, car ils représentent d'excellents systèmes pour étudier la modularité (Buchholtz, Booth et Webbink, 2007); les nageoires des poissons et les membres des tétrapodes (Campbell-Burke et Rosa-Molinar, 2002 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Hallgrímsson, Willmore et Hall, 2002 ; Lacquaniti *et al.*, 2013 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Shubin, Tabin et Carroll, 1997 ; Young et Hallgrímsson, 2005), l'ensemble des vertèbres des régions abdominale et caudale des poissons (Ward et Brainerd, 2007), des serpents (Polly, Head et Cohn, 2001), des lamentins

(Buchholtz, Booth et Webbink, 2007), des cétacés (Buchholtz, 2007) ainsi que la dentition des vertébrés (Stock, 2001) en sont tous des exemples.

Les nageoires paires et la colonne vertébrale sont parmi les systèmes morphologiques les plus étudiés en Évo-Dévo ; cependant, davantage d'informations au niveau paléontologique, embryologique et moléculaire sont requises, provenant d'espèces basales de groupes variés, afin d'établir les conditions morphologiques plésiomorphes, la trajectoire évolutive des modules, la formation de nouveautés évolutives, et déterminer les patrons de développement, tels les directions de minéralisation/ossification (Morin-Kensicki, Melancon et Eisen, 2002 ; Ota *et al.*, 2011 ; Yano et Tamura, 2013 ; Zhang, 2009).

Études en Évo-Dévo sur les nageoires et la colonne vertébrale des poissons

Il existe peu de modules morphologiques identifiés chez les poissons, et la majorité concerne les ostéichthyens (Cloutier, 2010 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Strauss, 1990 ; Ward et Brainerd, 2007). Ces modules ont été principalement caractérisés en utilisant les séquences de formation de radiaux et des rayons des nageoires médianes, qui varient entre différents groupes (Charest et Cloutier, 2008 ; Mabee *et al.*, 2002) et le nombre de vertèbres présentes dans certaines régions de la colonne vertébrale (Ward et Brainerd, 2007).

La présence de modularité chez les nageoires médianes a été suggérée par Mabee *et al.* (2002), qui décrit quatre patrons récurrents observés dans le développement des nageoires médianes des poissons et interprétés comme exemples de modules. Ceux-ci incluent un module de positionnement et trois modules de patrons développementaux (Mabee *et al.*, 2002).

Le module de positionnement concerne les nageoires dorsales et anales et leur apparente symétrie relativement à l'axe antéro-postérieur du corps. Le premier module de patron développemental concerne la direction (antéro-postérieure, bidirectionnelle, postéro-antérieure) dans laquelle les éléments de l'endosquelette (radiaux) et de l'exosquelette (rayons) des nageoires se forment. Cette direction apparaît constante pour les éléments des nageoires dorsale et anale chez tous les actinoptérygiens actuels (Mabee *et al.*, 2002); ceci signifie que si la différenciation des éléments de la nageoire dorsale procède suivant une direction antéro-postérieure pour une espèce donnée, cette direction de différenciation sera la même pour la nageoire anale.

Charest et Cloutier (2008) étudièrent la présence de modules chez plusieurs espèces d'actinoptérygiens actuels et fossiles et chez des espèces de sarcoptérygiens fossiles, et confirmèrent que ce module de patron développemental (dorsal-anal) est plésiomorphe pour les ostéichthyens. Un autre module a été décrit par Charest et Cloutier (2008), appelé le module de patron des rayons de la nageoire, qui est le patron récurrent (segmentation, ossification et bifurcation) de développement des lépidotriches (rayons) observé chez les ostéichthyens actuels et fossiles. Ils conclurent que le module des nageoires dorso-anales constitue un bon exemple de modules préservé à travers la phylogénie des ostéichthyens.

Le deuxième module de patron développemental, le module exosquelette-endosquelette, concerne la direction de formation des radiaux et des rayons des nageoires médianes ; dans tous les cas où la direction développementale est connue, elle est identique pour les radiaux et les rayons de la nageoire chez les actinoptérygiens (Mabee *et al.*, 2002). Ce module a été suggéré comme plésiomorphe pour les actinoptérygiens (Charest et Cloutier, 2008). Le troisième module de patrons de développement est appelé module de la première nageoire

dorsale et est présent seulement chez des poissons téléostéens dérivés, les acanthoptérygiens. La première nageoire dorsale est une nouveauté évolutive et donc non homologue à celle présente chez les téléostéens basaux (Mabee *et al.*, 2002) et à la première dorsale chez les autres gnathostomes, spécialement les espèces fossiles (R. Cloutier, comm. pers.).

Ainsi, un patron de direction de développement similaire des nageoires médianes semble être basal pour les actinoptérygiens, voir les ostéichthyens ; il est cependant impossible de déterminer la direction développementale basale pour les gnathostomes, puisqu'aucune information n'est disponible au sujet des séquences ontogénétiques (chondrification, minéralisation) chez les élasmobranches (raies et requins) (Mabee *et al.*, 2002).

La présence de modules de nageoires médianes a cependant été proposée chez certaines espèces de requins actuelles et fossiles. Maisey (2009) suggéra que les deux nageoires dorsales représentent des modules morphologiques réitérés chez les requins, puisqu'elles sont caractérisées par une morphologie similaire ; cette similarité est aussi présente au cours du développement dans leurs expressions géniques (Freitas, Zhang et Cohn, 2006).

Les chondrichthyens symmoriiformes fossiles (famille Stethacanthidae) démontrent une structure hautement dérivée, un complexe dorsal incluant une épine, qui serait le résultat d'une modification de la première nageoire dorsale (Coates et Sequeira, 2001a ; Coates *et al.*, 1998 ; Lund, 1985 ; Young, 1982), et d'une co-option du module de la première nageoire dorsale (Maisey, 2009). Cette structure est majoritairement observée chez les mâles (Lund, 1985 ; Maisey, 2009), et son lien avec le sexe de l'individu n'a été démontré que chez le symmoriiforme carbonifère *Falcatus* (Lund, 1985). Ce complexe épineux est suggéré comme étant homologue à une première nageoire dorsale hautement

dérivée, à cause de sa similarité structurale (présence d'une épine médiane et d'un cartilage basal chez certaines espèces) et donc ne représente pas une nouveauté évolutive (Maisey, 2009). Maisey (2009) suggéra que le complexe épineux chez *Falcatus* pourrait être homologue à la première nageoire dorsale de *Squalus acanthias*. Cette première nageoire dorsale chez *Falcatus* aurait subi plusieurs modifications tel qu'un développement retardé, une suppression chez les femelles et une acquisition de caractères autapomorphiques (Lund, 1985; Maisey, 2009).

Les nageoires médianes étant les premières à être apparues au cours de l'évolution des vertébrés (Cole et Currie, 2007 ; Suzuki *et al.*, 2003), les mécanismes responsables des patrons observés dans les nageoires médianes pourraient être précurseurs à ceux observés pour les nageoires paires (Mabee *et al.*, 2002). Ainsi, les mécanismes génétiques utilisés en premier dans les nageoires médianes pourraient avoir été re-déployés et ré-utilisés dans les nageoires paires (Freitas, Zhang et Cohn, 2006), et ces mécanismes auraient été conservés sur près de 500 millions d'années (Crotwell et Mabee, 2007 ; Dahn *et al.*, 2007 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2006).

Des études moléculaires corroborent ces hypothèses ; l'expression du gène *EphA4*, un récepteur à activité de tyrosine-kinase associé à la définition des limites spatiales pendant le développement, sont similaires entre les nageoires médianes et paires chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* (Freitas et Cohn, 2004). Cette similarité développementale fut aussi observée dans les expressions des gènes *HoxD* et *Tbx18* des nageoires médianes et paires (Freitas, Zhang et Cohn, 2006). Ainsi, des études morphologiques et moléculaires appuient la présence de modules dans les nageoires paires.

Les nageoires paires (pectorales et pelviennes) des poissons sont homologues aux membres pairs (antérieurs et postérieurs) des tétrapodes (Ahlberg et Clack, 2006 ;

Coates, 1995 ; Don, Currie et Cole, 2013 ; Hall, 2007 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; van Eeden *et al.*, 1996). Chez les tétrapodes, il a été suggéré que les membres postérieurs soient les homologues des membres antérieurs (Abbasi, 2011 ; Bininda-Emonds *et al.*, 2007 ; Campbell-Burke et Rosa-Molinar, 2002 ; Hallgrímsson, Willmore et Hall, 2002 ; Raff, 1996 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Tamura *et al.*, 2001 ; Young et Hallgrímsson, 2005) et que les membres pairs forment un module (Bolker, 2000 ; Eble, 2004 ; Raff, 1996 ; Young et Halgrímsson, 2007).

L'homologie des membres pairs est apparente dans le fait qu'ils démontrent la même morphologie structurale (stylopode proximal, zeugopode, autopode distal) et la même direction de développement (proximo-distale) ainsi que d'autres patrons développementaux similaires (Gilbert et Bolker, 2001 ; Young et Hallgrímsson, 2005). Les membres des tétrapodes sont aussi caractérisés en tant que modules morphologiques et développementaux (Young et Hallgrímsson, 2005).

L'homologie entre les nageoires pectorales et pelviennes est généralement acceptée (Bininda-Emonds *et al.*, 2007 ; Crotwell et Mabee, 2007 ; Horton *et al.*, 2008 ; Shubin, 1995) sauf par Coates et Cohn (1998, 1999). Coates et Cohn (1998, 1999) proposèrent que les nageoires paires ne sont pas homologues entre elles, car les nageoires pelviennes sont plus petites et possèdent une anatomie plus simple que les nageoires pectorales. De plus, Coates et Cohn (1998, 1999) suggérèrent que le patron phylogénétique des nageoires paires (pectorales et pelviennes) démontre peu d'évidence d'une évolution concertée. Jusqu'à présent, contrairement aux membres pairs, aucun module n'a encore été décrit pour les nageoires paires.

De plus, la caractérisation des similarités et différences entre les nageoires des

poissons et les membres des tétrapodes est un autre aspect hautement étudié en Évo-Dévo, et des études morphologiques et moléculaires sont utilisées afin de mieux comprendre l'évolution des nageoires paires en membres pairs des tétrapodes, et de déterminer la condition ancestrale (Shubin, Tabin et Carroll, 2009 ; Yano et Tamura, 2013). Ainsi, la transition entre nageoires de poissons et membres des tétrapodes a été largement investiguée et documentée, et il est généralement accepté que les nageoires pectorales sont apparues en premier dans le registre fossile (Coates, 2003 ; Janvier, Arsenault et Desbiens, 2004 ; Zhu et Yu, 2009). Cependant, comment les nageoires pelviennes sont apparues, et si celles-ci résultent d'une duplication des patrons développementaux des nageoires pectorales transposés postérieurement, demeure incertain (Cole et Currie, 2007 ; Don, Currie et Cole, 2013 ; Gillis, Dahn et Shubin, 2009a ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Les premiers vertébrés chez qui les nageoires pelviennes sont présentes sont les placodermes, qui sont phylogénétiquement basaux aux chondrichthyens (Brazeau, 2009 ; Trinajstić *et al.*, 2014). Les placodermes représenterait donc le groupe idéal pour étudier l'apparition des nageoires pelviennes. En effet, plusieurs états sont observés chez les placodermes : certains taxons ont des ceintures pectorales et pelviennes et des nageoires pectorales mais aucunes nageoires pelviennes, et d'autres ont des nageoires pectorales et pelviennes. Cependant, les placodermes ne peuvent être utilisés afin d'éclaircir cette question puisque l'information développementale sur les nageoires paires de ce groupe reste incomplète (Cloutier, 2010 ; Trinajstić *et al.* 2014).

Les informations développementales morphologiques appuyant l'hypothèse de la duplication sont rares ; les appuis proviennent surtout d'études moléculaires (Dahn *et al.*, 2007 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007). Originellement, il y aurait eu présence d'un seul gène ancestral *Tbx4/Tbx5* exprimé dans les nageoires pectorales, qui aurait été dupliqué et responsable de la

formation des nageoires pelviennes (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Ces gènes auraient initialement été tous deux exprimés dans chacune des nageoires, puis leur fonctions redondantes auraient résulté dans l'expression d'un seul gène : *Tbx5* dans les nageoires pectorales, *Tbx4* dans les nageoires pelviennes (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Ces gènes sont aussi exprimés dans les membres antérieurs et postérieurs respectivement, et sont étroitement impliqués dans le patterning (ordre et mise en place des éléments endosquelettiques) (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000), et ont été identifiés dans les nageoires paires de la raie *Raja kenoi* (Tamura *et al.*, 2001) et du requin *S. canicula* (Tanaka *et al.*, 2002).

Un autre facteur développemental est Sonic Hedgehog (*Shh*), important dans le patterning et l'élongation antéro-postérieur des nageoires et des membres des ostéichthyens (Sagai *et al.*, 2004). Afin de vérifier si *Shh* était un facteur d'origine ancestrale, Tanaka *et al.* (2002) ont étudié l'expression de *Shh* dans les nageoires de gnathostomes basaux, la raie *Raja erinacea* et le requin *Chiloscyllium punctatum* ; aucune expression de *Shh* n'a été observée chez les jeunes stades de développement (stades 27 et 28).

Cependant, Dahn *et al.* (2007) ont documenté *Shh* exprimé dans le mésoderme dorsal des nageoires paires et impaires de la raie *Leucoraja erinacea* et du requin *C. punctatum* chez des stades plus avancés ; cette expression était soutenue plus longtemps (jusqu'au stade 32) chez les mâles, dans les ptérygopodes. La différence d'âge des spécimens et l'expression tardive de *Shh* chez les élastomobranches pourraient expliquer la différence entre les résultats observés entre les deux études (Dahn *et al.*, 2007). Dahn *et al.* (2007) notèrent aussi que, similairement à la condition observée chez les ostéichthyens, l'acide rétinoïque contrôle l'expression de *Shh* chez les élastomobranches.

Ainsi, l'expression du facteur développemental *Shh* dans les nageoires paires et les membres de tétrapodes, ainsi que son contrôle par l'acide rétinoïque, représentent des conditions plésiomorphes, puisque partagées par les deux groupes. De plus, l'expression tardive de *Shh* lors de la formation des nageoires chez les élasmobranches résulterait en un rôle plus important pour *Shh* dans le patterning postérieur, plutôt que dans l'élongation antéro-postérieure des nageoires.

Des résultats similaires furent observés chez la raie *Raja kenoei* et le requin *Scyliorhinus torazame* par Yonei-Tamura *et al.* (2008) et chez *S. canicula* par Sakamoto *et al.* (2009). Ces derniers remarquèrent également que *Shh* est exprimé en même temps que *HoxD* 13. Les auteurs de ces études suggérèrent qu'une variation dans la dose d'acide rétinoïque et de l'expression de *Shh* pourraient être à l'origine des variations morphologiques (augmentation de la taille des éléments basaux de la nageoire, présence de radiaux surnuméraires) observées dans les nageoires (Dahn *et al.*, 2007 ; Sakamoto *et al.*, 2009 ; Yonei-Tamura *et al.*, 2008).

Les gènes *HoxA* et *HoxD* jouent un rôle essentiel dans la progression et la complétion développementale des membres pairs, leurs expressions étant similaires mais non identiques (Zakany et Duboule, 2007). Le développement des membres des tétrapodes est divisé en deux phases d'expression des *HoxA* et *HoxD*. Chez le téléostéen *D. rerio*, la première phase est similaire à celle des tétrapodes, avec l'expression de *HoxA*, *HoxD* et *Shh*, mais la deuxième phase, au cours de laquelle les gènes *HoxD-11*, *HoxD-12* ou *HoxD-13* sont exprimés, est absente (Sordino, van der Hoeven et Duboule, 1995).

Afin de valider que l'expression de deux phases d'expression des gènes *Hox* représentent la condition basale des gnathostomes, Freitas *et al.* (2007) ont étudiés les mécanismes moléculaires présents lors du développement des nageoires paires

chez *S. canicula*. L'analyse de l'expression des gènes *HoxD 9-13* démontra que *S. canicula* possède aussi deux phases d'expression, comme les tétrapodes, et donc que celle-ci ne reflète pas une condition dérivée des tétrapodes. Cette deuxième phase d'expression a aussi été observée chez un actinoptérygien basal, *Polyodon spathula* (Davis, Dahn et Shubin, 2007). De plus, Freitas *et al.* (2007) analysèrent l'expression du gène *Sox8*, présent dans les cellules pré-cartilagineuses, chez *S. canicula*. Cette analyse démontra que les éléments des nageoires paires de *S. canicula* se forment à partir de condensations individuelles comme chez les tétrapodes, et non par la perforation d'un disque de cartilage, comme chez les téléostéens.

Freitas et Cohn (2004) ont aussi observé, chez *S. canicula*, une expression de *EphA4* aux frontières de l'endosquelette et l'exosquelette ainsi que pendant la formation des radiaux. Les patrons d'expression d'*EphA4* étaient similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes. Le patron d'expression *EphA4* observé dans les nageoires pelviennes était légèrement différent du patron observé chez les membres postérieurs des tétrapodes, à cause de sa persistance à la limite distale du ptérygopode chez *S. canicula*. Malgré ceci, Freitas et Cohn (2004) conclurent que le patron d'expression d'*EphA4* entre les nageoires et les membres des tétrapodes est conservée, les différences étant due à la morphologie reproductive unique des chondrichthyens.

Ainsi, des expressions géniques similaires ont été documentées entre les membres pairs des tétrapodes et les nageoires des chondrichthyens ; parce que celles-ci sont partagées par les deux groupes, ces patrons d'expressions géniques ont été suggérées comme représentant une condition plésiomorphe (Freitas et Cohn, 2004). De plus, ces expressions sont similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes des chondrichthyens, appuyant l'hypothèse que les nageoires paires sont des structures homologues sériées et ce, même si elles exhibent des

morphologies différentes. Ceci est causé par le fait que les homologues sériés peuvent changer de morphologie, que ce soit une nageoire ou une vertèbre, due à des facteurs développementaux ou environnementaux (Hall, 1995b ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Young et Hallgrímsson, 2005).

Chez les tétrapodes, une expression génique similaire entre les membres antérieurs et postérieurs pourrait refléter un patron d'organisation standard, tandis que des différences spécifiques dans cette expression, ou des interactions entre les gènes, pourraient expliquer les différences entre les membres antérieurs et postérieurs (Ouimette *et al.*, 2010). Par exemple, chez la souris, les membres antérieurs et postérieurs possèdent une architecture et une expression des gènes *Hox* très similaire, contrairement au poulet chez qui les ailes et les pattes ont une expression différente (Shubin, Tabin et Carroll, 1997). Ainsi que mentionné plus haut, des expressions différentes de *Shh* peuvent contribuer à ces différences, ainsi que des facteurs comme *Pix1* qui peuvent contribuer à l'obtention d'une morphologie différente chez les membres postérieurs (Ouimette *et al.*, 2010). Ainsi, ces études moléculaires supportent l'hypothèse de la duplication, les nageoires pelviennes résultant d'une duplication des mécanismes développementaux observées chez les nageoires pectorales, mais réitérés postérieurement.

Donc, contrairement aux membres des tétrapodes et aux nageoires des ostéichthyens, il n'existe aucune étude morphologique détaillée relatant le développement des structures squelettiques chez une espèce de chondrichthyen. Ceci ne permet pas la validation des nageoires paires en tant que structures homologues sériés, la vérification de la présence de modules morphologiques et développementaux, et l'identification de conditions plésiomorphes. La condition plésiomorphe des nageoires paires chez les gnathostomes est incertaine, due à des relations phylogénétiques faiblement résolues, où il n'y a pas consensus dans les

relations entre les grands groupes de gnathostomes (Brazeau, 2009 ; Coates, 2003 ; Donoghue et Sansom, 2002 ; Goujet, 2001 ; Pradel *et al.*, 2013 ; Venkatesh, Erdmann et Brenner, 2001 ; Zhu et Yu, 2009).

Une autre question controversée au sujet des nageoires paires concerne la morphologie de leur condition plésiomorphe. Deux conditions différentes ont été suggérées comme plésiomorphes : la condition monobasale, où un seul élément basal (élément s'articulant avec la ceinture proximale et les radiaux des nageoires distalement) est présent (Goujet, 2001 ; Janvier, Arsenault et Desbiens, 2004 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Rosen *et al.*, 1981 ; Zhu et Yu, 2009), et polybasale, où plusieurs éléments basaux sont présents (Lund et Grogan, 1997), dont les conditions dibasale et tribasale.

La condition plésiomorphe des chondrichthyens est demeurée hypothétique due à un manque de consensus général sur les relations phylogénétiques entre les taxons fossiles (Grogan et Lund, 2009 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Pradel *et al.*, 2011 ; Stahl et Chatterjee, 2003) et à cause d'un registre fossile incomplet (Ginter, 2004 ; Grogan et Lund, 2000 ; Maisey, 2005). Cette condition basale de la nageoire pectorale chez les chondrichthyens, similairement à celle des gnathostomes, a été suggérée comme monobasale (Rosen *et al.*, 1981 ; Goujet, 2001 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003) ou tribasale (proptérygium, mesoptérygium et metaptérygium) (Coates, 2003 ; 1977, 1999 ; Mabee, 2000 ; Wagner et Larsson, 2007 ; Zhu et Yu, 2009).

La colonne vertébrale représente un autre système morphologique hautement étudié en Évo-Dévo (ten Broek *et al.*, 2012 ; Zhang, 2009). Bien qu'elle soit considérée idéale pour l'étude de la modularité, car composée d'unités homologues répétées (vertèbres) possédant des morphologies distinctes (Buchholtz, Booth et Webbink, 2007), peu d'études se sont penchées

sur la présence de modules dans ce système morphologique chez les poissons. Ward et Brainerd (2007) ont décrit deux modules présents chez les poissons, soit les modules abdominal et caudal, séparés par l'anus comme point de transition. Un module de positionnement, formé par la région située entre l'anus et l'insertion antérieure de la nageoire anale, a aussi été suggéré chez des poissons prédateurs à forme allongée (chondrostéens, Lepisosteiformes, Esociformes, Syngnathiformes, Beloniformes, Sphyracnidae) (Maxwell et Wilson, 2013). Chez les mammifères, des modules associés à la colonne vertébrale ont aussi été décrits. Des modules cervicaux et dorsaux ont été suggérés chez le lémentin (*Trichechus manatus latirostris*) (Buchholtz, Booth et Webbink, 2007) et un nouveau module traversant la limite précaudale-caudale a été suggéré chez les cétacés actuels (Buchholtz, 2007).

Il existe beaucoup plus d'études dédiées à la régionalisation de la colonne vertébrale qu'à la caractérisation de modules. La régionalisation de la colonne vertébrale en différentes régions distinctes le long de l'axe antéro-postérieur est contrôlée par les gènes *Hox* (Limura, Denans et Pourquié, 2009). L'un des aspects les plus étudiés de l'expression de ces gènes concerne leurs limites d'expression, puisque celles-ci correspondent généralement aux transitions morphologiques présentes au niveau de l'axe vertébral (Burke *et al.*, 1995). Chez les tétrapodes, six régions vertébrales sont présentes : occipitale, cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et caudale (Mallo, Wellik et Deschamps, 2010).

Chez les poissons (actinoptérygiens et chondrichthyens), deux régions sont traditionnellement reconnues, soient les régions abdominale et caudale, correspondant aussi à des modules développementaux (Nowroozi *et al.*, 2012 ; Ward et Brainerd, 2007). Cependant, plusieurs autres régions ont aussi été décrites chez des ostéichthyens vivants et fossiles (Bird et Mabee, 2003 ; Johanson, Sutija et Joss, 2005 ; Oulion *et al.*, 2011 ; Sallan, 2012), indiquant que plusieurs autres

régions vertébrales sont aussi présentes chez les poissons.

Afin de vérifier si la morphologie vertébrale était aussi corrélée avec un changement d'expression génique chez les chondrichthyens, Oulion *et al.* (2011) ont répertorié l'expression des gènes *Hox* le long de la colonne vertébrale de *S. canicula*. Ils remarquèrent que l'identité des différents types de vertèbres n'était pas la même chez les tétrapodes et *S. canicula*, bien que sous l'influence des mêmes gènes ; chez les tétrapodes, *Hox3-5* sont associés aux vertèbres cervicales, *Hox6* à la transition entre les régions cervicale et thoracique tandis que les gènes *Hox 9-10* sont associés aux vertèbres thoraciques et lombaires (Morin-Kensicki, Melancon et Eisen, 2002). Chez *S. canicula*, il existe très peu de régionalisation axiale, même si l'expression des gènes homologues est conservée.

Ainsi, l'expression des gènes ne correspond pas aux mêmes identités vertébrales (e.g., cervicales), excepté au niveau de la transition abdominale-caudale, où *Hox11* est exprimé (Oulion *et al.*, 2011 ; Oulion, Laurenti et Casane, 2012). Oulion *et al.* (2011) conclurent que l'expression spécifique des gènes *Hox* dans les somites est une architecture de base qui a subi très peu de changement à travers l'évolution des gnathostomes (Oulion *et al.*, 2011).

Une régionalisation est pourtant associée à deux régions de la colonne vertébrale chez certaines espèces de chondrichthyens : la région occipitale et la région cervicale. Ces régions, issues de somites post-otiques consécutives, peuvent être considérées comme homologues sériés (Johanson, 2010). La région occipitale du crâne inclut tous les éléments vertébraux (e.g., arches neurales, basidorsaux) qui se fusionnent au crâne au cours du développement ; dans certains cas, aucun élément distinct n'est inclut dans la partie occipitale (El-Toubi, 1949). Bemis et Forey (2001), après avoir révisé le nombre d'éléments présents chez différents ordres de poissons, suggérèrent que la condition plésiomorphe des poissons

actinoptérygiens était l'inclusion de trois segments dans la région occipitale. Bemis et Forey (2001) établirent que chez les chondrichthyens, une ou deux paires d'arcs neuraux étaient incorporées au chondrocrâne, basé sur les travaux de El-Toubi (1949) pour *S. acanthias* et Holmgren (1940) pour *Etmopterus* sp.. Bemis et Forey (2001) notèrent la difficulté d'établir une condition plésiomorphe due à l'incertitude des relations phylogénétiques entre les chondrichthyens fossiles.

La présence d'une région cervicale n'est pas limitée aux tétrapodes ; cette région a aussi été observées chez des espèces d'actinoptérygiens et de sarcoptérygiens actuels (Johanson, Sutija et Joss, 2005 ; Morin-Kensicki, Melancon et Eisen, 2002 ; Nowroozi *et al.*, 2012) et fossiles (Sallan, 2012). Une région cervicale a aussi été suggérée chez le chondrichthyen *S. canicula* (Sallan, 2012). Les vertèbres présentes dans cette région peuvent aussi être modifiées en une structure complexe, aussi considérée comme une régionalisation : l'appareil de Weber, présent chez les téléostéens Ostariophysi, en est un exemple (Bird et Mabee, 2003 ; Lechner *et al.*, 2011).

Chez la région correspondant à la région cervicale des chondrichthyens, une modification des vertèbres antérieures est aussi présente. Plusieurs ordres de requins (Squatiniforme, Pristiophoriformes, Orectolobiformes, Carchariniformes) démontrent une modification des basiventraux associés aux premières vertèbres (Claeson et Hilger, 2011). Une structure complexe, appelée synarcuum (également appelé synarcual) est aussi présente dans cette région et est constitué d'éléments vertébraux fusionnés. Cette structure est présente chez les raies et les chimères (Holocephali) et est considérée comme une régionalisation de la colonne vertébrale (Johanson *et al.*, 2013). Cependant, il existe très peu d'études dédiées à la caractérisation de cette structure. Un synarcuum est aussi observé chez certaines espèces de placodermes (Placodermi), qui sont des gnathostomes n'ayant que des espèces fossiles (Johanson, Carr et Ritchie, 2010 ; Johanson *et al.*,

2013).

Le synarcuum des placodermes, raies et chimères n'est vraisemblablement pas homologue entre ces différents groupes (Johanson, Carr et Ritchie, 2010 ; Johanson *et al.*, 2013), quoiqu'aucune étude ontogénétique détaillée, que ce soit au point de vue moléculaire (chondrichthyens actuels) ou morphologique (chondrichthyens et placodermes), n'a été faite à ce sujet, probablement dû au peu d'information ontogénétique disponible. Cependant, plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer la formation de cette structure modifiée. Johanson *et al.* (2010) étudièrent le complexe occipital-synarcuum du placoderme dévonien *Cowralepis mclachlani* ; ce poisson possède, dans les stades tardifs de développement, une région occipitale et un synarcuum à la morphologie similaire, en forme de cônes opposés. Johanson *et al.* (2010) suggérèrent qu'une modification de l'expression des gènes paralogues (A, B, C, D) du complexe *Hox3* et *HoxD4* en était la cause, puisque ceci peut résulter en un changement d'identité des vertèbres. Plusieurs malformations, dont la fusion entre vertèbres, sont observées chez les tétrapodes et résultent de l'expression modifiée des gènes *Zic*, *Gli-3*, *Pax-1*, *Msx-1* et *Msx-2* ; ces mésexpressions géniques pourraient possiblement expliquer l'apparition et la formation de synarcua chez les chondrichthyens (Johanson, Carr et Ritchie, 2010). Une fusion des vertèbres cervicales et des changements au niveau des arcs neuraux a été observées chez des souris doublement mutantes pour les gènes *HoxB* et *HoxD*, ce qui a aussi été proposé comme hypothèse afin d'expliquer la formation du synarcuum (Soshnikova *et al.*, 2013).

Ainsi, bien que l'expression génique au cours du développement de certaines structures morphologiques est relativement bien connue pour les chondrichthyens, les informations au sujet de leur développement morphologique (chondrification, minéralisation) demeurent incomplètes. Ce manque d'information sur les

séquences nuit à l'identification de l'état plésiomorphe des patrons développementaux résultant de mécanismes communs, de l'identification de modules et leur trajectoire évolutive, l'établissement des tendances évolutives générales, et la détermination et la validation d'homologie de structures similaires.

1.2 Sujet de recherche

Les chondrichthyens actuels : élasmobranches et holocéphales

Les études phylogénétiques démontrent que les chondrichthyens représentent un groupe monophylétique défini par la présence de cartilage prismatique minéralisé et de ptérygopodes, qui représentent les deux synapomorphies des chondrichthyens (Grogan et Lund, 2004 ; Maisey, 1984). Les espèces actuelles sont subdivisées en deux groupes, les élasmobranches (raies et requins) et les holocéphales (chimères) (Figure 1.1) (Amemiya *et al.*, 2013 ; Grogan et Lund, 2004 ; Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Inoue *et al.*, 2010 ; Maisey, 1984, 1986 ; Schaeffer, 1981 ; Schaeffer et Williams, 1977). Cette division est basée, en partie, sur le type de suspension de la mâchoire, sur des traits crâniens et sur le type de dentition (Grogan et Lund, 2000 ; Maisey, 1986 ; Patterson, 1965 ; Stahl, 1967). Suivant des études moléculaires, la séparation entre les élasmobranches et les holocéphales se situerait il y a environ 400 millions d'années (Figure 1.1) (Inoue *et al.*, 2010 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Le registre fossile démontre que les holocéphales auraient été présent minimalement au Carbonifère, il y a environ 300 millions d'année (Grogan et Lund, 2004 ; Pradel *et al.*, 2011).

Les élasmobranches sont subdivisés en Selachii (requins) et Batoidea (incluant les raies, les poissons-guitares et les poissons-scies) (Aschliman, Claeson et McEachran, 2012 ; Compagno, 1977, 1999 ; Inoue *et al.*, 2010). Les Selachii sont

à leur tour subdivisés en deux superordres, Galeomorphii et Squalomorphii (Heinicke, Naylor et Hedges, 2009 ; Musick et Ellis, 2005). Certaines études phylogénétiques, basées sur des caractères morphologiques, suggéraient que les raies avaient évolué d'un groupe de requins fusiformes, et devraient être considérées comme des requins hautement modifiés (Shirai, 1992; 1996 ; De Carvalho, 1996). Basé sur cette première hypothèse, les raies seraient phylogénétiquement proches des requins squaliformes ; cependant, des études récentes basées sur des données morphologiques et moléculaires ont démontré que les requins et les raies étaient en réalité des groupes frères (Aschliman, Claeson et McEachran, 2012 ; Douady *et al.*, 2003 ; Dunn et Morrissey, 1995 ; Inoue *et al.*, 2010 ; Maisey, 2004 ; Naylor *et al.*, 2005 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013).

Ainsi, les raies et requins se seraient séparés l'un de l'autre très tôt dans leur histoire, il y a environ 300 millions d'années (Figure 1.2) (Heinicke, Naylor et Hedges, 2009 ; Inoue *et al.*, 2010 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013). Il existe plus de 541 espèces de requins et 680 espèces de raies (Naylor *et al.*, 2012). Les 45 espèces de chimères actuelles sont toutes membres de l'ordre des Chimaeriformes, et divisées en trois familles, soit Chimaeridae, Callorhynchidae et Rhinochimaeridae (Didier, 2004). Le terme élasmobranche (requins et raies) réfère aux fentes branchiales individuelles et cloisons interbranchiales plates observées sur les surfaces latérales postérieures à la tête de ces chondrichthyens (Compagno, 1999). Les élasmobranches ont le palatocarré, élément qui forme la partie supérieure de l'arc mandibulaire, non fusionné au crâne (Compagno, 1999).

Le terme holocéphale se réfère à la fusion complète du palatocarré avec le chondrocrâne (Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Lund et Grogan, 1997). Ce groupe se distingue aussi par la présence de plaques dentaires hyper minéralisées non-remplaçables (Didier, 1995 ; Didier, Stahl et Zangerl, 1994 ; Lund et Grogan, 1997 ; Maisey, 1986).

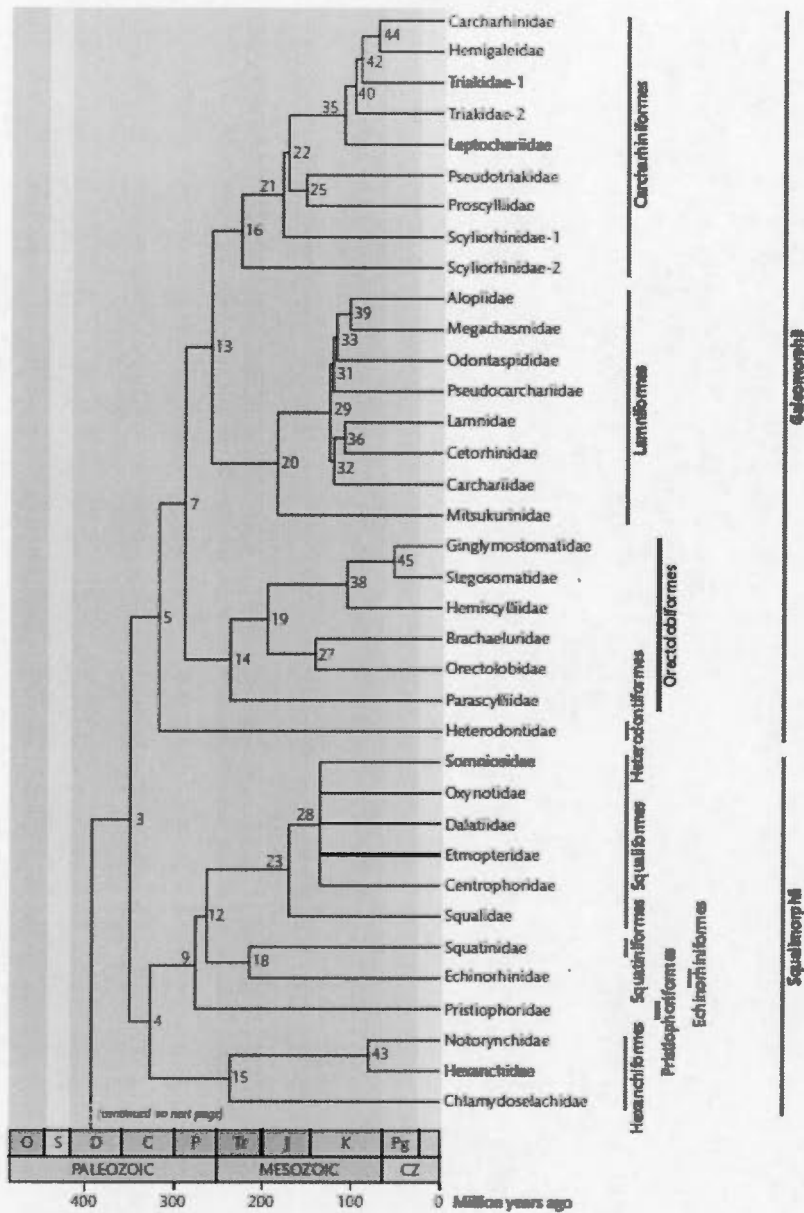


Figure 1.1. Phylogénie moléculaire, démontrant les relations entre les différentes familles de chondrichthyens (requins, raies et chimères) et leur temps de divergence approximatif. Abréviations : C (Carbonifère), CZ (Cénozoïque), D (Dévonien), J (Jurassique), K (Crétacé), O (Ordovicien), P (Permien), Pg (Paléogène), S (Silurien), Tr (Trias). Figure tirée de Heinicke *et al.* (2009).

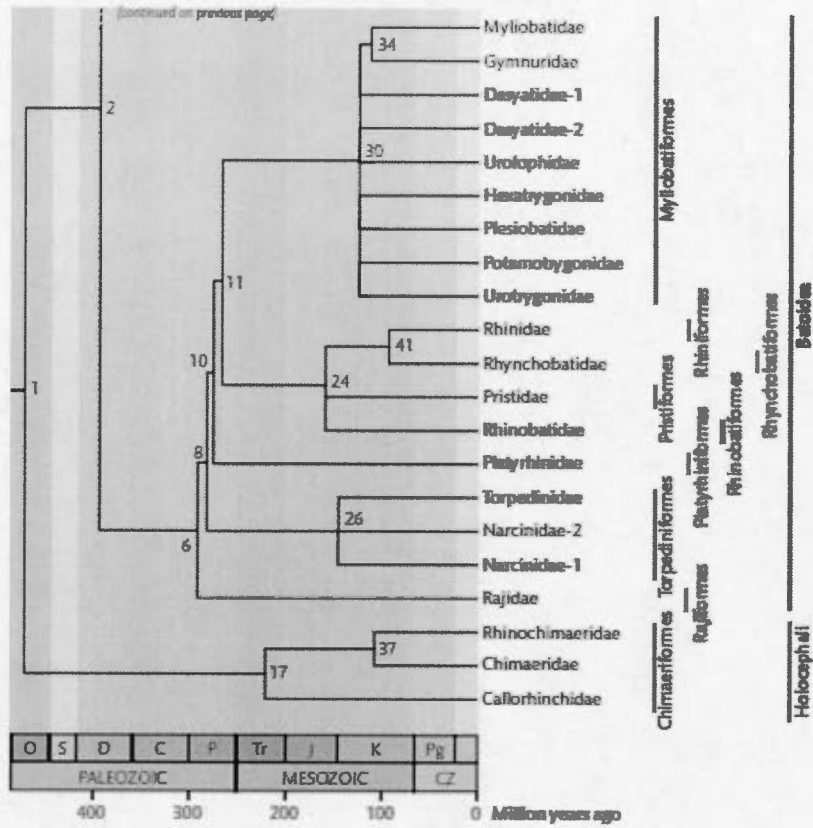


Figure 1.1. (Suite)

Les chondrichthyens : taxons essentiels pour l'étude de l'évolution

Le manque d'information sur les processus de chondrification et minéralisation des chondrichthyens est surprenant, considérant que les jeunes stades de requins ont été un sujet d'étude prisé depuis des siècles, démontré par l'importante quantité d'ouvrages qui leur est dédiés. Récemment, Wourms (1977), Wourms et Demski (1993), Didier (1995), Grogan et Lund (1997), Wourms (1997), Rodda et Seymour (2008) et Wyffels (2009) ont révisé le développement embryonnaire et la biologie reproductive des chondrichthyens.

La majorité de ces études sur les embryons et juvéniles de chondrichthyens sont principalement descriptives, illustrant leur morphologie interne et externe. D'autres études décrivent l'environnement dans lequel l'embryon se développe, que cet environnement soit une oothèque ou le système reproducteur de la femelle. Müller (1842) est responsable de ce qui a été désigné comme la première étude moderne sur la biologie reproductive des chondrichthyens, dans laquelle il passe en revue les études antérieures, et procède à la description et à la comparaison des embryons entre un ensemble d'espèces ovipares et vivipares (Wourms, 1977, 1997 ; Wourms et Demski, 1993).

Les études descriptives sur l'embryologie des élasmobranches au tournant du 20^{ième} siècle arrivèrent à leur apogée avec la publication de "*A Monograph on the Development of Elasmobranch Fishes*" par Balfour (1878) et l'étude de Scammon (1911) intitulée "*Normal Plates of the Development of *Squalus acanthias**" décrivant la progression du développement chez *S. acanthias*. Ces ouvrages, comprenant des descriptions détaillées et des illustrations remarquables, sont les premiers à utiliser des repères développementaux tels des stades (Balfour, 1878) et des longueurs (Scammon, 1911).

Cependant, plusieurs problèmes ont été associés avec ces deux études, tels l'utilisation de plusieurs espèces par Balfour (1878) afin de compléter la séquence de croissance d'élasmobranches utilisés, et le nombre limité de longueurs de spécimens et l'âge inconnu des embryons décrit par Scammon (Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993 ; Rodda et Seymour, 2008). Malgré tout, le travail de Scammon (1911) constitue la première table de développement normal établie pour une espèce d'élasmobranche, produite à la suite des monographies de Keibel (1897–1938) "*Normal Plates of the Development of the Vertebrates*" dont le but était de fournir une information valide sur l'embryologie de plusieurs espèces de vertébrés (Hopwood, 2007).

L'intérêt des chercheurs de cette époque pour les embryons de chondrichthyens est confirmé par les centaines d'ouvrages cités dans le document de Scammon (1911). Ce besoin accru d'informations au sujet de l'embryologie d'un vertébré considéré "primitif" provient du mouvement darwinien recherchant une base développementale commune en appuie à la théorie évolutionniste de l'ancêtre commun des vertébrés (Hall, 2009 ; Hopwood, 2007 ; Richardson *et al.*, 1997). Les tables de développement normal de différentes espèces étaient utilisées comme outils de laboratoire, établissant des ensembles comparables de périodes développementales suivant un format spécifique. Celles-ci pouvaient être utilisées dans le contexte d'études comparatives sur l'embryologie évolutive afin de comprendre comment la diversité d'organismes provient d'un stock ancestral commun (Hopwood, 2007 ; Richardson *et al.*, 1997). La prédilection de Goodrich (1906) pour l'embryon d'élasmobranche continua de l'établir en tant que modèle pour les études comparatives au début du 20^{ème} siècle (Cole et Currie, 2007). Des embryons et juvéniles de raies et de chimères furent aussi décrits et étudiés (Balfour, 1878 ; Dean, 1906 ; Schauinsland, 1903), mais de façon plus sporadique.

Pendant la première moitié du 20^{ième} siècle, les tables normales utilisées pour les études embryologiques furent graduellement remplacées par des stades développementaux standardisés (différents de ceux publiés par Balfour en 1878) comme outils entre les différents chercheurs afin de faciliter la communication entre les laboratoires de recherche (Pollister et Moore, 1937 cités par Hopwood, 2007). Il est intéressant de noter qu'en conséquence de la rigueur du travail descriptif effectué sur le développement des élasmobranches au tournant du siècle, ce domaine fût considéré complété (Wyffels, 2009) et donc aucune table moderne de stades développementaux n'a été compilée pour les élasmobranches jusqu'à des décennies plus tard. De plus, la difficulté d'obtenir des spécimens d'élasmobranches ouvra la voie à l'utilisation d'organismes dont la provenance et l'utilisation expérimentale étaient plus facile, tels la grenouille, la souris et le poulet, qui devinrent les nouveaux modèles prisés (Wourms, 1997 ; Wourms et Whitt, 1981).

Un changement s'opéra donc au milieu du 20^{ième} siècle, et les études embryologiques, n'étant plus l'objectif principal de la recherche sur les élasmobranches, furent incorporées sous la bannière plus large de la biologie reproductive (Babel, 1967 ; Baughman, 1955 ; Castro, Bubucis et Overstrom, 1988 ; Hisaw et Albert, 1947 ; Martin et Cailliet, 1988 ; Natanson et Cailliet, 1986 ; von Bonde, 1945a, 1945b). Il resta cependant quelques travaux descriptifs concernant l'embryologie des raies (Clark, 1927 ; Coles, 1914 ; Notarbartolo-di-Sciara et Serena, 1988) et des requins (Appukuttan, 1978 ; Baranes et Wendling, 1981 ; Gilmore, Dodrill et Linley, 1983 ; Goodrich, 1906 ; Gudger, 1940 ; Hussakof, 1912 ; Nair et Appukuttan, 1974 ; Smith, 1942 ; Te Winkel, 1950 ; von Bonde, 1945b ; von Bonde, 1945a). De plus, de nouvelles voies furent explorées, comme la physiologie, la biochimie et la chimie associées aux caractéristiques développementales des élasmobranches, surtout de 1955 à 1975 (Wourms, 1977, 1997 ; Wourms and Demski, 1993 ; Wyffels, 2009).

Le retour de l'intérêt pour l'embryologie revint au début des années 1990, avec la publication d'une étude-phare signalant un retour notable de l'utilisation de stades développementaux : la publication de Ballard *et al.* (1993) "A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*" sur le développement morphologique externe de la petite roussette. Ce travail, un ensemble standardisé des stades de développement pour cette espèce, donna enfin aux chercheurs un outil commun afin d'identifier les stades de développement utilisés au cours de leur recherche sur les élasmobranchs (Adachi et Kuratani, 2012 ; Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993 ; Ferreiro-Galve *et al.*, 2008 ; Freitas et Cohn, 2004 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Sueiro *et al.*, 2003 ; Tanaka *et al.*, 2002 ; Werneburg, 2009b).

Ceci reflète une situation similaire à celle observée au début du 20^{ième} siècle avec d'autres organismes modèles tels *Amblystoma* ou le poussin (Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993). Suivant le travail fait par Ballard *et al.* (1993), d'autres travaux descriptifs sur le développement embryonnaire utilisant des stades ou des intervalles de temps suivirent : Luer *et al.* (2007) décrivent le développement embryonnaire externe de la raie hérisson *Leucoraja erinacea* ; Maxwell *et al.* (2008) décrivent les stades développementaux de la raie tachetée *Leucoraja ocellata* et Rodda et Seymour (2008) décrivent l'oothèque, les stades morphologiques externes et structures embryonnaires associées au requin dormeur cornu *Heterodontus portusjacksoni*. Finalement, Didier *et al.* (1998) décrivent les stades développementaux externes de la chimère-éléphant (*Callorhynchus milii*).

Il est important de noter que toutes ces études décrivent la morphologie externe associée aux différents stades de développement, et ne font pas mention des structures internes du squelette (endosquelette) associées à ces stades. Leur principale utilité dans le contexte des études en Évo-Dévo est d'être utilisée à des

fins comparatives entre espèces, où les espèces de chondrichthyens sont devenus des modèles prisés. Cependant, à part deux exception près (Gillis, Dahn et Shubin, 2009 ; Gillis *et al.*, 2011), ces études en Évo-Dévo ne décrivent pas le développement morphologique endosquelettique mais se concentrent surtout sur les processus moléculaires et l'identité des gènes *Hox* présents chez les chondrichthyens.

Bien que la majorité des études sur les gènes *Hox* se soient concentrée sur les ostéichthyens, l'utilisation de nouveaux modèles, telles certaines espèces de chondrichthyens, permet une exploration plus poussée de l'expression de ces gènes (Kuraku, 2011 ; Oulion *et al.*, 2011). De plus, la position phylogénétique basale des chondrichthyens comparativement aux osteichthyens les rend essentiels dans la compréhension de l'histoire évolutive et de la diversité des gènes *Hox* (Oulion *et al.*, 2010 ; Robinson-Rechavi, Boussau et Laudet, 2004 ; Venkatesh *et al.*, 2007), des nouveautés morphologiques évolutives (Takechi *et al.*, 2011), des conditions ancestrales (Coolen *et al.*, 2007 ; D'Souza *et al.*, 2013 ; Dahn *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Moldes *et al.*, 2011) et des relations phylogénétiques (Cao *et al.*, 1998 ; Inoue *et al.*, 2010) des gnathostomes.

Les premières études sur l'expression des gènes *Hox* chez les chondrichthyens se concentrèrent sur le requin *Heterodontus francisci* (Kim *et al.*, 2000). Deux complexes *Hox* furent répertoriés (*HoxM* et *HoxN*), homologues aux complexes *HoxA* et *HoxD* des tétrapodes (Kim *et al.*, 2000 ; Prohaska *et al.*, 2004). Des recherches subséquentes démontrèrent que les élasmobranches possèdent un total de trois complexes, soit les complexes A, B et D (King *et al.*, 2011 ; Oulion *et al.*, 2010). Les fonctions du complexe C auraient été assez redondantes que la perte de ce complexe aurait été compensée par l'action des autres complexes (Oulion, Laurenti et Casane, 2012). Chez la chimère-éléphant *Callorhinchus milii* (Holocephali), des études ont confirmé la présence de quatre complexes *Hox*

homologues à ceux retrouvés chez les ostéichthyens (Venkatesh *et al.*, 2007). De plus, les chondrichthyens ont gardé davantage de gènes *Hox* ancestraux comparativement aux ostéichthyens (Kuraku, 2011) et semblent évoluer plus lentement que ceux-ci (Martin, Naylor et Palumbi, 1992 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Plusieurs études ont aussi démontré que les séquences génomiques entre chondrichthyens et tétrapodes sont plus similaires entre elles qu'avec les téléostéens (Chiu *et al.*, 2002 ; Kuraku et Meyer, 2009 ; Putnam *et al.*, 2008 ; Venkatesh *et al.*, 2006).

Les taxons basaux aux gnathostomes, tels les céphalochordés et les lamproies, possèdent 15 et 14 gènes *Hox* respectivement (Mehta et al. 2013 ; Oulion, Laurenti et Casane, 2012). Ainsi, un nombre élevé de gènes *Hox* semble être la condition plésiomorphe chez les vertébrés actuels. Chez les gnathostomes actuels, les chimères et les coelacanthes possèdent la structure moléculaire la plus proche d'un modèle ancestral (Oulion, Laurenti et Casane, 2012), puisqu'en plus ils ont un 14^{ième} gène *Hox* (A et D). Comparativement, les tétrapodes n'en possèdent que 13, suite à une perte (Ferrier, 2004 ; Hoegg et Meyer, 2005 ; Powers et Amemiya, 2004). De plus, la chimère-éléphant est le vertébré avec le plus lent taux d'évolution de tous (Venkatesh *et al.*, 2014). Ces informations confirment l'importance et la validité des chondrichthyens en tant que groupe modèle basal dans la résolution de questions en biologie évolutive du développement. La position phylogénétique basale des chondrichthyens repose donc sur des évidences moléculaires (Amemiya *et al.*, 2013 ; Cotton et Page, 2002 ; Hedges, 2001 ; Inoue *et al.*, 2010 ; Kikugawa *et al.*, 2004 ; Takezaki *et al.*, 2003 ; Zardoya et Meyer, 2001) et morphologiques (Donoghue et Purnell, 2005 ; Donoghue et Sansom, 2002 ; Janvier, 1996 ; Maisey, 1986 ; Schaeffer, 1981 ; Smith, Donoghue et Sansom, 2002 ; Young, 1986).

Les chondrichthyens, actuels et fossiles, sont donc des taxons essentiels dans la

détermination de l'état basal ancestral des gnathostomes (Coolen *et al.*, 2007 ; Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Gillis *et al.* 2011 ; Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Maisey, 1986 ; Patterson, 1977) et la polarisation de l'état des modules observés chez les actinoptérygiens (Mabee *et al.*, 2002) et les sarcoptérygiens (Charest et Cloutier, 2008 ; Cloutier, 2010 ; Cloutier et Leblanc, 2006). Les modules évolutifs peuvent être conservés sur de longues périodes temporelles (Schlosser, 2004 ; Von Dassow et Munro, 1999) ce qui rend les espèces fossiles une source cruciale d'informations dans les études ontogénétiques et phylogénétiques (Cloutier *et al.*, 2010). Cette information peut, en retour, être utilisée afin de construire des arbres phylogénétiques et déterminer quels modules sont plésiomorphes ou dérivés (Mabee, 2006).

Cependant, la polarisation des caractères par des espèces de chondrichthyens actuelles et fossiles est complexe et risquée, car leurs liens phylogénétiques ne sont pas entièrement résolus (Coates et Sequeira, 2001b ; Didier, 1995 ; Dunn, 1983 ; Dunn et Morrissey, 1995 ; Ginter et Turner, 2010 ; Grogan et Lund, 2000, 2004 ; Guinot, Adnet et Cappetta, 2012 ; Janvier, 1996 ; Klug et Kriwet, 2010 ; Lund et Grogan, 1997 ; Maisey, 1984, 2012 ; Naylor *et al.*, 2005 ; Pradel, 2010 ; Pradel *et al.*, 2013 ; Pradel *et al.*, 2009 ; Pradel *et al.*, 2011). Cette complication réside en partie dans le manque de spécimens complets adéquatement fossilisés, puisque le registre fossile chondrichthyen est surtout composé d'éléments exosquelettiques, principalement des dents (Guinot, Adnet et Cappetta, 2012 ; Klug *et al.*, 2009 ; Maisey, 1986, 2001 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003 ; Stingo et Capriglione, 1986). Les plus anciens chondrichthyens fossiles remontent au Silurien inférieur, il y a environ 440 millions d'années (Coates et Sequeira, 2001a ; Grogan et Lund, 2004 ; Inoue *et al.*, 2010 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003). Le registre fossile chondrichthyen est principalement constitué d'écailles isolées, de denticules dermales, d'épines et de dents ; ceci est dû au fait que leur endosquelette est principalement constitué de cartilage et de minéralisation qui se

fragilisent généralement au moment de leur fossilisation (Cappetta, 1987 ; Cloutier, 2010 ; Ginter, 2004 ; Janvier, 1996 ; Klug *et al.*, 2009 ; Leidner et Thies, 1999 ; Lund et Grogan, 1997 ; Maisey, 2012 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003 ; Musick, Harbin et Compagno, 2004 ; Zangerl, 1981).

Très peu de spécimens fossiles bien préservés sont disponibles, ce qui rend l'étude de leur patrons évolutifs une tâche plus difficile (Cappetta, 1987 ; Grogan et Lund, 2000 ; Lund et Grogan, 1997 ; Pradel, 2010). Conséquemment, la littérature concernant l'anatomie des espèces éteintes est limitée (Klug *et al.*, 2009 ; Maisey, 2005, 2012 ; Zangerl, 1997) spécialement regardant les jeunes stades ontogénétiques (Soler-Gijón, 2004 ; Cloutier, 2010). Idéalement, des stades ontogénétiques d'espèces fossiles devraient être utilisés afin de polariser les modules développementaux des chondrichthyens actuels. La majorité des informations publiées sur les stades pré-adultes chez les chondrichthyens du Paléozoïque provient de quelques sites fossilifères avec des conditions de préservation exceptionnelles, tel le site de Bear Gulch au Montana, USA (318 millions d'années) (Cloutier, 2010 ; Grogan et Lund, 2004 ; Hagadorn, 2002 ; Lund et Poplin, 1999 ; Zangerl, 1997).

Bien qu'il soit très rare de trouver des spécimens immatures de chondrichthyens fossilisés, quatre spécimens immatures fossilisés de la chimère *Echinochimaera meltoni* ont été retrouvés au site carbonifère de Bear Gulch. Une étude préliminaire réalisée sur ces spécimens n'a permis qu'une description limitée de la formation de l'endosquelette chez cette espèce. Quelques études incluent aussi des stades immatures d'espèces fossiles de chondrichthyens (Claeson, 2011 ; Grogan and Lund 2011 ; Lund, 1980 ; Zangerl, 1979), mais l'information disponible sur le développement de l'endosquelette complet demeure limitée. Ainsi, il en revient aux jeunes stades des espèces actuelles de chondrichthyens d'apporter de nouvelles informations sur le développement afin de mieux comprendre

l'évolution du squelette et des vertébrés en général.

Cartilage et minéralisation

L'endosquelette des chondrichthyens, constitué de cartilage, ne se transforme pas en os comme chez les ostéichthyens ; il demeure cartilagineux, mais se recouvre d'une mince couche de minéralisation plutôt que de s'ossifier (Dean et Summers, 2006 ; Grogan et Lund, 2004 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Moss, 1977). Il est cependant suggéré que la condition primitive des gnathostomes était probablement un squelette de cartilage recouvert d'os périchondral (Grogan et Lund, 2004 ; Janvier, 1996 ; Ørvig, 1951).

L'analyse du cartilage de requin n'a pas reçu autant d'attention que celui des ostéichthyens, et des études comparatives et compréhensives sur la nature moléculaire et fonctionnelle du cartilage sont nécessaires (Zhang, Eames et Cohn, 2009). La matrice cartilagineuse des éléments endosquelettiques est entourée d'un périchondre fibreux, et est similaire en nature au cartilage hyalin (Dean, Chiou et Summers, 2005). Les chondrocytes produisent une matrice cartilagineuse riche en protéoglycans qui sont responsables de la turgescence du cartilage, et de fibres de collagène de type II qui assurent la tension de la matrice (Dean, 2011).

Des analyses effectuées sur la raie *Raja kenoi* ont démontrées que les collagènes de type I et II sont des composés majeurs du cartilage tandis que le collagène de type XI est une composante mineure (Mizuta, Hwang et Yoshinaka, 2003) ; quoique la présence de collagène de type I a subséquentement été mise en doute (Eames *et al.*, 2007), elle a aussi été observée chez *S. acanthias* par Yucha (1998). Les collagènes de type I et II ont aussi été reportés chez le requin *Carcharias acutus* (*Rhizoprionodon acutus*) (Sivakumar et Chandrakasan, 1998). Yucha (1998) et Grogan et Yucha (1999) ont observé que le collagène de type I

est présent seulement lorsque le périchondre s'épaissit chez *S. acanthias*. Il est intéressant de noter que des requins d'une même espèce mais provenant de localités différentes possèdent du collagène démontrant des propriétés chimiques différentes, tels des différences dans la concentration d'éléments individuels, qui sont dépendant des localités (Edmonds *et al.*, 1996).

Les avantages de posséder un endosquelette fait de cartilage, plutôt que d'os, est de bénéficier ainsi d'une plus grande flexibilité et d'un poids réduit ; cependant, cela diminue aussi sa robustesse (Dingerkus, Séret et Guilbert, 1991 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Summers, 2000). Afin de compenser pour ceci, différents types de minéralisation renforcent efficacement le cartilage en des endroits stratégiques, où un endosquelette plus fort est avantageux (Glowacki *et al.*, 1986 ; Kemp et Westrin, 1979), lui permettant ainsi de résister à des stress mécaniques importants comme la nage rapide (Kemp et Westrin, 1979 ; Porter *et al.*, 2006 ; Summers, 2000).

Il existe trois formes de minéralisation présent dans l'endosquelette des chondrichthyens : (1) globulaire, considérée comme un stade précoce de minéralisation ; (2) prismatique et (3) aréolaire (Ørvig, 1951). La minéralisation aréolaire n'est présente que dans les centra vertébraux, tandis que tous les autres éléments endosquelettiques se recouvrent d'une mince couche de tesserae (Figure 1.3) (Applegate, 1967).

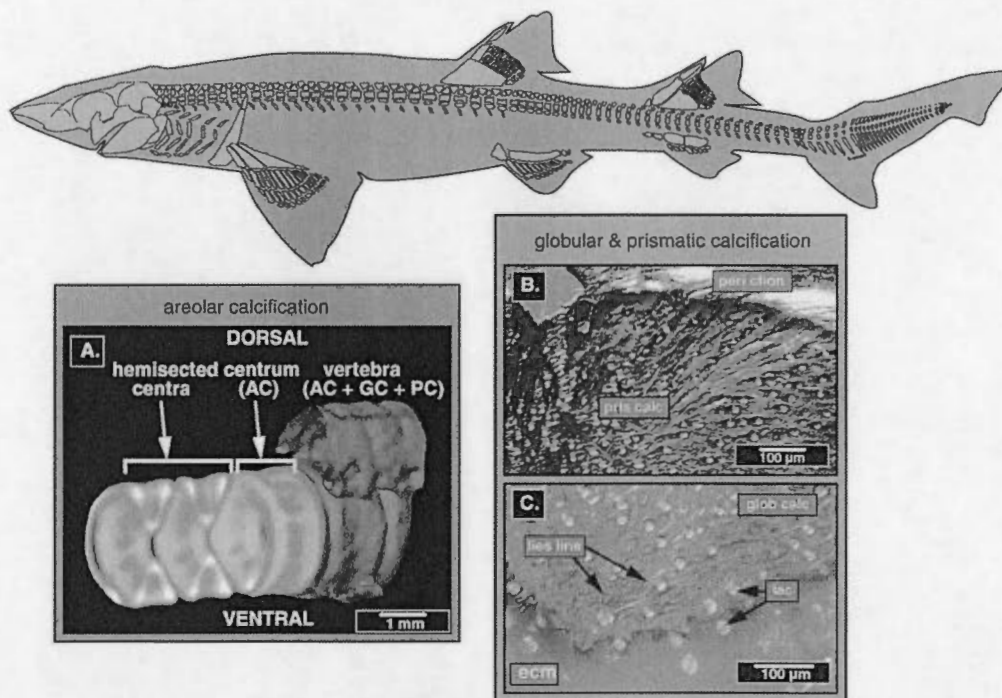


Figure 1.3. Schéma d'un squelette de requin démontrant la distribution de la minéralisation composée de tesserae (vert) et de cartilage aréolaire (orange). A. Minéralisation aréolaire (AC) présente dans le centrum seulement ; les vertèbres sont formées des trois types de minéralisation : aréolaire (AC), globulaire (GC) et prismatique (PC). B. Minéralisation prismatique (pris calc) située sous le périchondrium (peri chon). C. Minéralisation globulaire (glob calc) située près de la matrice cartilagineuse (ecm) ; on peut voir les chondrocytes dans leur cavité (lac) et les lignes de Liesegang (lies lines). Figure tirée de Dean et Summers (2006).

Deux formes de minéralisation, globulaire et prismatique, sont assemblées en des blocs minéralisés appelés tesserae (Applegate, 1967 ; Campinho, Moutou et Power, 2004 ; Dean et Summers, 2006 ; Grogan et Lund, 2004 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Moss, 1977 ; Ørvig, 1951). La minéralisation composée de tesserae est ainsi appelée à cause de l'apparence superficielle de ce cartilage minéralisé qui ressemble à de petites tuiles en mosaïque (Applegate, 1967). Les tesserae ressemblent à des tuiles minéralisées hexagonales placées l'une contre l'autre, connectées par des paquets de fibres de collagènes (Kemp et Westrin, 1979) et recouvrent la majorité des éléments endosquelettiques (Dean et Summers, 2006 ; Eames *et al.*, 2007 ; Yucha, 1998).

La minéralisation tesserale est retrouvée chez tous les chondrichthyens actuels et fossiles (Dingerkus, Séret et Guilbert, 1991 ; Grogan et Lund, 2004 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Maisey, 1984, 2012) et semble permettre une croissance par apposition de tesserae, sans un remodelage répété des éléments endosquelettiques, comme c'est le cas pour l'ossification endochondrale (Clement, 1986 ; Kemp et Westrin, 1979). Les tesserae restent généralement non-fusionnées, et l'espace entre elles est utilisée afin de permettre l'expansion de l'endosquelette et l'ajout de nouvelles tesserae puisque les éléments endosquelettiques prennent de l'expansion à la fois en profondeur et en largeur pendant la croissance (Dean *et al.*, 2009 ; Kemp et Westrin, 1979).

Les tesserae sont placées entre le périchondre fibreux et la matrice cartilagineuse non minéralisée (Figure 1.4). Une tessera contient deux zones, la calotte (cap) et le tronc (body) (Kemp et Westrin, 1979). La calotte est faite de cartilage prismatique et est située directement sous le périchondrium fibreux alors que le tronc est constitué de cartilage globulaire minéralisé, adjacent à la matrice de cartilage non minéralisée. La minéralisation globulaire est caractérisée par la présence de calcosphérites qui sont de petites agglomérations sphériques de

phosphate de calcium (Moss, 1977). La minéralisation de la matrice cartilagineuse est performée à travers la déposition de cristaux d'hydroxyapatite (Applegate, 1967; Dean *et al.* 2005). Ces cristaux sont aussi retrouvées dans l'os, l'émail, la dentine et le cartilage calcifié présents chez les autres groupes de vertébrés (Applegate, 1967 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Ørvig, 1951).

Le cartilage globulaire et prismatique ont été suggérés comme étant respectivement un stade précoce et un stade avancé d'un même type de minéralisation (Ørvig, 1951) ce qui a été confirmé par Yucha (1998). Une autre particularité des cartilages minéralisés des chondrichthyens est que les chondrocytes restent viables (Moss, 1977).

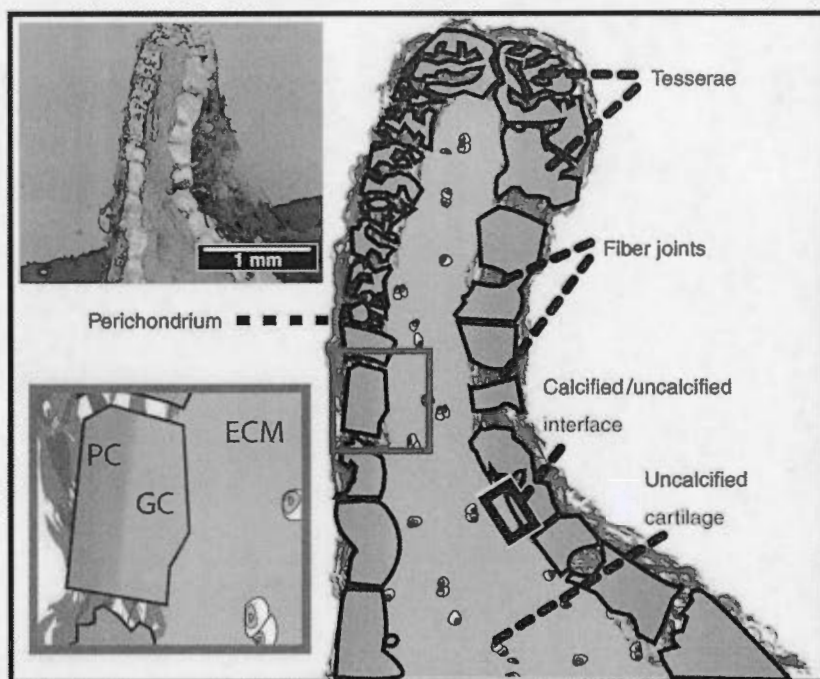


Figure 1.4. Schématisation de cartilage d'élasmobranch non-minéralisé et minéralisé (à droite), basée sur une coupe provenant de la mâchoire inférieure de la raie *Urobatis halleri* (en haut, à gauche). Les tesserae (en bas, à gauche) sont des blocs constitués de minéralisation prismatique (PC) et de minéralisation globulaire (GC), coincés entre le périchondrium fibreux et la matrice de cartilage non minéralisé. Figure tirée de Dean et Summers (2006).

La chondrification et la minéralisation sont dépendantes de contraintes phylogénétiques, fonctionnelles et génétiques ainsi que de facteurs externes (flottabilité, équilibre, paramètres de croissance et stress mécanique) (Grogan et Lund, 2004 ; Hall, 1975 ; Maisey, 2004 ; Muhammad *et al.* 2012 ; Yucha, 1998). Peu d'information a été publiée sur l'influence des conditions environnementales sur la formation des structures anatomiques chez les chondrichthyens en particulier, et plus spécifiquement sur la minéralisation des tesserae (Porter, Koob et Summers, 2007 ; Yucha, 1998).

Chez les chondrichthyens, la combinaison de tuiles rigides d'hydroxyapatite que sont les tesserae et de cartilage viscoélastique crée une structure résistante au stress et à la fatigue (Dean, Chiou et Summers, 2005). Un support mécanique supplémentaire peut être obtenu de deux façons : en augmentant le nombre de couches de tesserae dans une région spécifique contrainte au stress ou en ajoutant des trabécules, qui sont des structures de soutien (Daniel, 1934 ; Dingerkus, Séret et Guilbert, 1991 ; Summers, 2000). Dingerkus *et al.* (1991) ont trouvé jusqu'à cinq couches de tesserae présentes dans les mâchoires de grandes espèces de requins afin de renforcer celles-ci et d'assurer leur puissance de morsure. Plusieurs couches de tesserae ont aussi été trouvées à l'intérieur de mâchoires de raies de la famille des Myliobatidae (Dean, 2011). Les trabécules sont des supports creux couverts de tesserae, qui s'étendent à travers du cartilage non-minéralisé de la surface d'un élément endosquelettique à un autre, fournissant ainsi un renforcement structural (Summers, 2000).

Des trabécules ont été observées à l'intérieur des mâchoires de raies de la famille Myliobatidae et des arcs branchiaux de la raie électrique brésilienne *Narcine bancroftii* (Dean, 2011 ; Summers, 2000). De plus, Yucha (1998) observa que la première apparition de minéralisation, chez un embryon de *Squalus acanthias*, était sur le côté labial du cartilage de Meckel. Yucha (1998) suggéra que ceci pourrait être occasionné par le stress mécanique imposé par l'attachement du muscle adductor mandibulae à la mâchoire résultant du mouvement de celle-ci par l'embryon.

Le cartilage aréolaire est un autre cartilage minéralisé que l'on retrouve dans l'endosquelette, et est seulement présent dans les centra des élasmobranches et des espèces fossiles phylogénétiquement proches (Figure 1.4) (Ørvig 1951 ; Kemp and Westrin, 1979 ; Miller *et al.*, 2003 ; Grogan and Lund 2004). La minéralisation des centra semble différente selon les espèces : chez *S. acanthias*,

la minéralisation aréolaire ne provient pas de la minéralisation du cartilage hyalin, mais d'une minéralisation directe des cellules fibroblastes densément arrangées autour du centre (Grogan et Yucha, 1999). Ceci résulte en des anneaux d'hydroxyapatite dense apposés les uns contre les autres, entourant la notochorde (Kemp et Westrin, 1979 ; Ørvig, 1951 ; Porter *et al.*, 2006). Le centrum croît en ajoutant ces anneaux par apposition aux extrémités périphériques antérieure et postérieure (Dean, 2011).

La morphologie, la densité minérale et les patrons de la minéralisation aréolaire varient à l'intérieur d'un individu, à l'intérieur d'une espèce et entre espèces ; ses propriétés matérielles ont été comparées à l'os trabéculaire des mammifères (Grogan et Yucha, 1999 ; Moss, 1977 ; Porter *et al.*, 2006 ; Porter, Koob et Summers, 2007). Grogan and Yucha (1999) proposèrent que les trois modes de minéralisation endosquelettique sont plutôt la calotte et le tronc de la tessera et la minéralisation aréolaire associée à la notochorde, puisque les formes globulaires et prismatiques de calcification apparaissent être des stades développementaux différents du même type de minéralisation.

La compréhension de la minéralisation chez les chondrichthyens est importante, puisque la minéralisation tésserale constitue une variation développementale du patron de formation des tissus endosquelettiques caractéristiques des premiers gnathostomes (Grogan et Lund, 2004 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003 ; Smith et Hall, 1990), dont le cheminement évolutif reste inconnu (Dean, Huber et Nance, 2006). Malgré la quantité d'études sur l'embryologie des éla-smobran-ches, l'ordre d'apparition des structures endosquelettiques et leurs subséquentes minéralisation n'ont pas été décrites de façon exhaustive (Maisey, 2009 ; Pradel *et al.*, 2013).

Séquences développementales chez les chondrichthyens

Les descriptions anatomiques complètes relatant le développement de l'endosquelette sont rares chez les vertébrés en général, et en particulier pour chondrichthyens (Didier 1995).

Chondrocrâne. Le chondrocrâne des chondrichthyens a été le sujet de nombreuses études (Balfour, 1878 ; de Beer, 1937 ; El-Toubi, 1949 ; Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971 ; Maisey, 2004 ; Pradel *et al.*, 2013 ; Schauinsland, 1903). Malgré ceci, il existe peu d'information sur la formation de la région occipitale des chondrichthyens, (Bemis et Forey, 2001), et la majorité d'entre elles concerne seulement quelques espèces de requins. De Beer (1937) a révisé le développement du crâne chez les chondrichthyens, en utilisant des études antérieures et ses propres observations sur la petite roussette (*S. canicula*) et le requin *H. portusjacksoni*. La mise en place des éléments cartilagineux lors de la formation du chondrocrâne suit un ordre similaire entre les diverses espèces de requins selon de Beer (1937).

Chez l'aiguillat commun (*S. acanthias*), les premières structures à se former dans le chondrocrâne sont les parachordaux pairs le long de la notochorde, suivit des capsules otiques dorsalement aux parachordaux, et de l'arc occipital ; des foramens pour le passage des nerfs de la région occipitale apparaissent aussi, avec l'incorporation des éléments vertébraux. Ce qui est différent cependant est l'identité et le nombre d'éléments vertébraux incorporés dans la partie occipitale du chondrocrâne. Les éléments vertébraux qui sont incorporés à la région occipitale incluent une paire de basidorsaux, d'interdorsaux, d'arcs neuraux et possiblement un centrum (de Beer 1937 ; El-Toubi, 1949 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971). Chez *S. canicula*, la région occipitale est formée possiblement de trois arcs neuraux (de Beer 1937 ; Holmgren, 1940). Chez *H. portusjacksoni*, il y

aurait deux segments vertébraux d'incorporés à la région occipitale, plus un centrum (de Beer, 1924, 1937). Chez *Pristiurus melanostomus*, il semblerait y avoir trois basidorsaux et trois basiventraux, avec au moins un interdorsal et un interventral [Matveiev (1925) d'après de Beer 1937].

Holmgren (1940) observa plusieurs éléments vertébraux (basidorsaux, basiventraux, interdorsaux, arcs vertébraux) incorporés dans la région occipitale d'*Etmopterus spinax*. Chez les raies, peu d'informations existent sur l'identité des éléments incorporés ; quelques illustrations démontrent la présence de foramen pour les nerfs (Holmgren, 1940). Une des seules informations disponibles sur la partie occipitale du chondrocrâne chez les chimères concerne *Callorhinchus antarticus*, où six foramens ventraux et un foramen dorsal sont illustrés (Schauinsland, 1903) ; ceci pourrait suggérer l'incorporation de six segments vertébraux dans la partie occipitale, quoique ceci n'est pas mentionné par Schauinsland (1903). L'identité des éléments incorporés dans la partie occipitale et leur nombre est inconnue chez les chimères.

Arcs branchiaux. Gillis *et al.* (2011) étudièrent la chondrogénèse et l'expression génique (*Shh* et *Ptc2*) des arcs branchiaux chez deux espèces d'élaémobranthes (*S. canicula* et *L. erinacea*) et une espèce de chimère (*C. milii*) afin de déterminer la condition plésiomorphe des arcs branchiaux chez les chondrichthyens. La morphologie des arcs branchiaux des chimères est caractérisée par la présence d'un opercule supporté par des rayons hyoïdiens, et diffère des élaémobranthes qui eux possèdent ces rayons sur les arcs hyoïdiens et branchiaux. Le patron général de formation des rayons est partagé par les deux groupes ; cependant, la condition observée chez les élaémobranthes semble être le résultat de la prolongation de l'expression de *Shh*, et la condition observée chez la chimère apparaît être une condition dérivée (Gillis *et al.* 2011).

Synarcuum. Immédiatement postérieur à la région occipitale, les raies et les chimères possèdent un synarcuum formé par une fusion des premiers éléments de la colonne vertébrale. Miyake (1988) décrit la formation du synarcuum chez trois différents groupes de raies, basée sur quelques spécimens. Bien que les patrons de chondrification du synarcuum paraissent varier entre les différents groupes, une généralité commune réside dans le fait que les éléments se forment en premier à la limite postérieure du synarcuum, puis ensuite à l'intérieur des limites du synarcuum (Miyake, 1988). Chez le plus petit (53 mm de longueur) des deux spécimens de *Leucoraja erinacea* (Rajidae) étudiés par Miyake (1988), les premiers éléments à se former sont les basidorsaux, les basiventraux (qui formeront subséquemment les côtes et les arcs hémaux) et les interdorsaux le long de la partie dorsale de la notochorde. Les projections latérales du synarcuum sont chondrifiées, mais le reste du synarcuum n'est pas encore chondrifié et consiste seulement de la notochorde. Chez le plus grand spécimen (55 mm de longueur), les basidorsaux et les basiventraux apparaissent à l'intérieur du synarcuum, suivant une direction postéro-antérieure. Les cartilages suprascapulaires sont fusionnés aux cartilages médians du synarcuum et les interdorsaux se sont développés ventralement. Ainsi, tous ces éléments apparaissaient individuellement chez les spécimens observés par Miyake (1988), et n'étaient pas encore fusionnés en un synarcuum.

Miyake (1988) décrit aussi la formation du synarcuum chez deux spécimens de *Narcine brasiliensis* (Narcidinae). Chez le plus petit spécimen (34 mm de longueur), les centra sont en continuité avec les côtes et les arcs haemaux, et contrairement à *L. erinacea*, les basidorsaux et basiventraux sont placés dorsalement et ventralement sur la notochorde, postérieurement au synarcuum. La surface dorsale du synarcuum est recouverte de cartilage et un basidorsal, deux interdorsaux et deux basiventraux sont présents dorsalement et ventralement adjacent à la limite postérieure du synarcuum ; les projections latérales sont

présentes. Chez le plus grand spécimen (36 mm de longueur), la crête médiane se chondrifie dorsalement, et plusieurs centra sont inclus dans la région postérieure du synarcuum ; le nombre d'éléments dorsaux (basidorsaux et interdorsaux) et ventraux (basiventraux) est le même que chez le plus petit spécimen. Ainsi que chez *L. erinacea*, la partie dorsale du synarcuum est composée des basidorsaux et d'interdorsaux tandis que la partie ventrale est composée de basiventraux et de côtes. Chez le seul spécimen d'*Urotrygon venezuelae* (Urotrygonidae) (28 mm de longueur), les interdorsaux, basidorsaux, basiventraux et côtes apparaissent en tant qu'éléments séparés, non fusionnés. À l'intérieur du synarcuum, les centra ne sont pas présents, seulement la notochorde. Le synarcuum se chondrifie dorso-ventralement, et les projections latérales sont incomplètes. Cette étude de Miyake (1988) représente la seule étude morphologique décrivant la formation précoce du synarcuum chez les raies. Cette étude de Miyake (1988) démontre que le synarcuum est formé d'éléments cartilagineux qui apparaissent individuellement, et non d'une structure entière complète et que les centra ne participent pas à la formation du synarcuum.

Claeson (2011) a décrit la chondrification du synarcuum de *Raja asterias* ; les spécimens étudiés possédaient déjà un synarcuum formé de cartilage, qui entoure le premier centrum postérieurement. Les arcs neuraux s'ajoutent à la limite postérieure du synarcuum en suivant une direction antéro-postérieure. Une seconde direction de chondrification est observée dans le synarcuum, soit ventro-dorsale.

La formation du synarcuum de la chimère *Callorhinchus milii* a aussi été investiguée récemment par Johanson *et al.* (2015). La progression de la formation du synarcuum a été suivie en injectant aux embryons utilisés le marqueur fluorescent *Sox9* qui identifie les structures pré-cartilagineuses ; les résultats démontrent que le synarcuum résulte d'une fusion d'éléments vertébraux distincts.

Colonne vertébrale. Hormis les études concernant le développement du synarcuum, il existe très peu d'information sur la chondrification de la colonne vertébrale des chondrichthyens. Les études portant sur la formation de la colonne vertébrale concernent surtout les très jeunes stades et la mise en place des tissus formant celle-ci (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Coolen *et al.*, 2007 ; Eames *et al.*, 2007 ; Goodrich, 1906). La colonne vertébrale et l'arc mandibulaire sont les premiers éléments à se chondrifier chez le requin holbiche ventrue *Cephaloscyllium ventriosum* (Eames *et al.*, 2007).

Chez les élasmobranches, les premiers éléments cartilagineux qui se forment autour de la notochorde sont, généralement, les basidorsaux et basiventraux (de Beer, 1937 ; Goodrich, 1906 ; Miyake, 1988). Les arcs neuraux et hémaux (et les côtes) associés aux basiventraux et basidorsaux se forment subséquemment, avec les interdorsaux (Holmgren 1940) ; la chondrification se poursuit ensuite en continuité avec les arcs neuraux et hémaux vers la notochorde (Goodrich, 1906).

Nageoires paires. Le développement des nageoires paires a été étudié chez la petite roussette *S. canicula* par Balfour (1881), Goodrich (1906) et plus récemment par Freitas *et al.* (2007). Balfour (1881) remarqua que les premiers stades de développement des nageoires pectorales et pelviennes sont très similaires. Les structures sont mésenchymateuses chez les jeunes stades, et cartilagineuses dans les stades plus avancés. Chez les jeunes stades, la barre basale des nageoires (qui se différencie éventuellement en éléments basaux) est en connection avec les ceintures pectorale et pelvienne. Cette barre basale est aussi continue avec une plaque distale qui se divise subséquemment en radiaux.

Goodrich (1906) étudia le développement des nageoires paires de *S. canicula* et observa aussi que tous les éléments des nageoires paires étaient connectés les uns

aux autres pendant la phase pré-cartilagineuse ; les radiaux apparaissent comme des bandes de mésenchyme plus denses. Les sections médianes de ces radiaux sont déjà séparées tandis que leurs sections proximales et distales ne le sont pas. Le basiptyrgium démontre des signes de segmentation, comme si cet élément basal résultait de la fusion de radiaux. Les ceintures pectorales et pelviennes et éléments basaux se chondrifient en premier. Un patron de développement similaire a été observé par Holmgren (1933) chez des embryons de *Spinax* sp. (*Etmopterus*), où l'élément basal primaire pré-cartilagineux se divise en proptyrgium, mésoptyrgium et métaptyrgium, et les précurseurs des radiaux se forment subséquent. Les éléments basaux de la nageoire se chondrifient en premier, suivit des radiaux.

Freitas *et al.* (2007) observèrent que les plaques de mésenchymes des nageoires pectorales et pelviennes de *S. canicula* sont perforées par apoptose des cellules avant le début de la chondrification ; les éléments basaux se chondrifient en premier suivant un patron proximo-distal, suivit des radiaux qui se chondrifient suivant la même direction (Freitas, Zhang et Cohn, 2007). Les éléments basaux des nageoires paires sont aussi formés par la perforation d'une plaque de mésenchyme chez *Pristiurus* (Cohn *et al.*, 2002a). Les études plus récentes cependant ne décrivent pas en détail le développement endosquelettique des nageoires et du reste du squelette (Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993 ; Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Eames *et al.*, 2007 ; Wyffels, 2009).

Balfour (1881) étudia aussi le développement avancé des nageoires paires chez *Scyliorhinus stellare*. Initialement, une barre basale se sépare de la ceinture pectorale. Cette barre basale se subdivise en deux parties, la plus petite partie antérieurement et la plus grande postérieurement. La partie antérieure de la barre basale s'articule avec le scapulocoracoïde, et contient les ébauches du proptyrgium et mésoptyrgium et de leur radiaux associés. Les radiaux sont unis

distalement par une bande continue de cartilage. À l'intérieure de la nageoire pelvienne, les radiaux présents antérieurement s'articulent directement avec la ceinture pelvienne, et les radiaux postérieurs avec le basiptérygium. Le basiptérygium se sépare subséquentement de la ceinture pelvienne (Balfour, 1881).

Les aspects connus de la chondrification chez les chondrichthyens peuvent se résumer ainsi : la partie occipitale des chondrichthyens peut inclure plusieurs différents éléments vertébraux, et sa composition varie entre les espèces. Le synarcuum des raies se chondrifie à partir d'éléments similaires (basidorsaux, interdorsaux, basiventraux), qui ne sont pas localisés aux mêmes endroits sur la notochorde, et qui se chondrifient suivant des patrons différents. Finalement, les nageoires paires se chondrifient à partir d'éléments de mésenchymes suivant une direction proximo-distale, et ces éléments apparaissent individuellement, similairement aux éléments des membres pairs des tétrapodes. Toutefois, aucune information n'est disponible sur la chondrification des éléments des nageoires paires chez les raies et les chimères.

Le patron développemental de la minéralisation chez les chondrichthyens peut être complexifié par le fait qu'il semble dépendant des conditions environnementales comme la flottabilité, l'équilibre, les paramètres de croissance et le stress mécanique (Grogan et Lund, 2004 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Hall, 1975 ; Maisey, 2004). Les contraintes phylogénétiques sont difficiles à établir puisque la majorité des études concernant les tendances évolutives de la minéralisation des éléments endosquelettiques des poissons se concentrent sur les ostéichthyens (Britz et Johnson, 2010 ; Hall, 2005 ; Johnson et Britz, 2010 ; Schoch, 2006).

La séquence de minéralisation des chondrichthyens qui ont été décrites en détail concernent surtout le crâne ; la minéralisation des vertèbres a aussi été décrite en

détail, mais non sa progression le long de l'axe vertébral. La séquence de minéralisation du reste de l'endosquelette a été décrite de façon générale. Jollie (1971) a décrit la minéralisation du cartilage du chondrocrâne et des arcs viscéraux chez *S. acanthias*. La minéralisation commence dans les mâchoires, près des extrémités symphysiales et sur les surfaces dorsales. Puis, elle apparaît simultanément à plusieurs endroits sur l'arc hyoïdien. Au moment de la naissance (env. 235 mm de longueur), la région occipitale de *S. acanthias* et les régions adjacentes à l'articulation de l'hyomandibulaire montrent de la minéralisation. Sur la partie ventrale du chondrocrâne, les régions adjacentes aux nerfs optiques, ainsi que la bordure ventrale du processus postorbital sont minéralisées. Sur la partie dorsale du chondrocrâne, il n'y a que quelques traces de minéralisation apparentes. Tous les épibranchiaux, cératobranchiaux et pharyngobranchiaux (excepté pour le cinquième) sont minéralisés, ainsi que les hypobranchiaux associés aux arcs branchiaux deux et trois (Jollie, 1971).

Une autre étude sur la progression de la minéralisation chez *S. acanthias* a été performée par Yucha (1998). Yucha (1998) examina la présence de minéralisation de quatre régions distinctes de l'endosquelette de *S. acanthias* (la crête supra-orbitale, le cartilage de Meckel, les arcs neuraux et les centra vertébraux) à quatre stades ontogénétiques (embryon avec réserve vitelline, embryon pré-naissant, sub-adulte et adulte). La minéralisation débute sur le côté lingual du cartilage de Meckel des embryons et se poursuit antérieurement et ventralement sur les deux côtés du cartilage de Meckel des embryons pré-naissants. Le centrum exhibe les premières traces de minéralisation au stade d'embryon pré-naissant et la minéralisation tesserale apparaît ensuite aux lisières internes et externes des arcs neuraux et finalement à l'intérieur de la crête supra-orbitale chez les spécimens sub-adultes. Les tesserae augmentent en taille entre le stade sub-adulte et le stade adulte. Le centrum est presque entièrement minéralisé au stade adulte.

Summer *et al.* (2004) décrivent la progression de la minéralisation de trois stades du requin *H. francisci*, soit un néonate, et quatre spécimens de juvéniles et d'adultes. Le chondrocrâne du néonate était minéralisé dans la région de la plaque basale, des cartilages trabéculaires, des parachordaux et la région otique du chondrocrâne près de l'articulation avec l'hyomandibulaire. Cependant, le restant du crâne, incluant les régions optique et olfactive, était peu minéralisé. Dans l'arc mandibulaire, la lisière dorsale du palatocarré et les portions dorsale et ventrale du cartilage de Meckel étaient bien minéralisés, comparés à leur surface latérale. Le joint articulaire reliant l'arc mandibulaire démontrait une minéralisation abondante. Dans l'arc hyoïdien, le cératohyal et l'hyomandibulaire étaient minéralisés. Chez les spécimens juvéniles, la section postérieure du chondrocrâne était davantage minéralisée que chez le néonate, et les régions nasales et optiques démontraient des signes de minéralisation. De plus, les cartilages labiaux et ventraux étaient complètement minéralisés et visible en tant qu'éléments séparés. La mâchoire était complètement minéralisée, à l'exception d'une petite partie centrale du palatocarré. Le joint entre le cartilage de Meckel et le palatocarré était plus fortement minéralisé que chez le néonate. Chez les adultes, les cartilages nasaux étaient bien minéralisés ainsi que la région optique. Les mâchoires possédaient à leur surface plusieurs couches de tesserae et sembleraient être parmi les premiers éléments à se minéraliser.

La minéralisation du synarcuum de plusieurs espèces de Rajidae a été étudiée par Claeson (2011). Le synarcuum de cinq spécimens juvéniles d'*Okamejei kenojei* étaient entièrement minéralisé excepté pour une lisière centrale, qui se minéralise éventuellement de façon antéro-postérieur pendant le développement. Claeson (2011) rapporte que la minéralisation du synarcuum était tardive comparée au reste de l'endosquelette, et progressait suivant des directions latéro-médiale et antéro-postérieure. Des comparaisons interspécifiques et intraspécifiques ont démontré que le patron de minéralisation du synarcuum était différent du patron

de chondrification, qui progresse ventro-dorsalement. La minéralisation des basiventraux du synarcuum progresse suivant plusieurs directions (latéro-médial et antéro-postérieur). De plus, la minéralisation du synarcuum est accélérée chez les espèces atteignant leur maturité à de petite taille, et ceci à la fois chez les espèces vivipares et ovipares (Claeson, 2011).

Johanson *et al.* (2013) décrivent la composition du synarcuum chez des embryons de quatre espèces de raies (*Dasyatis americana*, *Raja texana*, *Rhinobatos lentiginosus*, *Torpedo torpedo*) et une espèce de chimère (*Chimaera monstrosa*). Le nombre et l'âge exacte de ces spécimens ne sont pas mentionnés. La progression de la minéralisation de ces embryons n'est pas décrite ; cependant, les figures 6 et 7 démontrent que tous les centra des spécimens de raies sont minéralisés comparées aux autres éléments vertébraux, qui ne sont que chondrifiés. Chez *Torpedo torpedo*, les régions antérieures et postérieures du synarcuum apparaissent minéralisées ainsi que les premiers arcs neuraux placés postérieurement au synarcuum. Chez *Rhinobatos lentiginosus* et *Raja texana*, la région antérieure du synarcuum est minéralisée. Le synarcuum de *Dasyatis americana* n'est pas minéralisé. Pour ce qui est de la chimère, le synarcuum de l'embryon semble complètement minéralisé, ainsi que les basiventraux présents sur la notochorde, postérieur au synarcuum ; les basidorsaux sur la notochorde ne semblent pas minéralisés. Ainsi, chez les raies le synarcuum semble se minéraliser après la colonne vertébrale, contrairement à la chimère, où le synarcuum semble être minéralisé et non la colonne vertébrale.

La minéralisation des nageoires pectorales a été examinée par Schaefer et Summers (2005) afin de comprendre les effets du stress de locomotion sur la minéralisation des éléments cartilagineux. Deux patrons de minéralisation tesserale ont été observés, soit crustal et concaténé. Le patron crustal consiste de tesserae juxtaposées les unes aux autres, formant un tapis ; le patron concaténé

consiste de chaînes de tesserae réparties le long des radiaux des nageoires pectorales, seulement. Ils observèrent un haut degré de variation inter-spécifique et intra-individuelle dans le degré de minéralisation tessérale. Le degré et la complexité de la minéralisation des radiaux sont associés à leur position axiale à l'intérieur de la nageoire : ainsi les éléments au centre exhibent une plus grande quantité et une plus grande complexité de minéralisation. La minéralisation des nageoires paires chez les spécimens immatures semble progresser suivant une direction proximo-distale, puisque les éléments squelettiques (basaux, radiaux) situés dans la partie proximale de la nageoire étaient minéralisés, comparé aux radiaux situés distalement qui eux ne l'étaient pas (Schaefer and Summers, 2005). Schaefer et Summers (2005) suggérèrent que la présence de minéralisation concaténée représente une condition néoténique, et que les espèces possédant une minéralisation crustale pourrait avoir une minéralisation concaténée quand ils sont juvéniles.

Benzer (1944) étudia 75 spécimens d'aiguillat commun (*Squalus acanthias*) et remarqua que la minéralisation est présente dans les mâchoires en premier, puis les arcs branchiaux, suivit du crâne simultanément avec les vertèbres, incluant les centra. La dernière partie du crâne à se minéraliser est le rostre. Les ceintures pectorale et pelvienne se minéralisent ensuite, et les nageoires sont les dernières structures à se minéraliser. À l'intérieur des nageoires, les éléments basaux se minéralisent en premier. Benzer (1944) remarqua aussi que la minéralisation procède de manière concertée avec la chondrification, car les premières traces de minéralisation dans le crâne apparaissent sur les premières structures qui se chondrifient selon l'information fournie par de Beer (1937), c'est-à-dire les parachordaux et les trabeculae.

Eames *et al.* (2007) étudièrent la minéralisation présente chez certains éléments endosquelettiques chez des spécimens du requin *C. ventriosum* de longueurs

différentes. Les embryons de 5 cm de long ne démontrèrent aucun signe de minéralisation de leur endosquelette, mais les denticules dermiques de la nageoire caudale étaient minéralisées. Chez les embryons de 9 cm de long, seulement des portions de vertèbres (non-spécifiées) étaient minéralisées, ainsi que les dents et denticules dorsales. Chez les embryons de 15 cm, la plupart des éléments du crâne, de la colonne vertébrale (vertèbres et centra), des ceintures pectorale et pelvienne, et les radiaux des nageoires médianes étaient minéralisés, ainsi que les denticules crâniens. Aucune minéralisation n'était présente cependant sur les radiaux des nageoires paires. Donc, il semblerait que la colonne vertébrale chez *C. ventriosum* soit le premier système morphologique qui se minéralise, ainsi qu'observé chez les spécimens de raies présentés dans les figures de Johanson *et al.* (2013).

Mis à part la minéralisation observée sur le synarcuum représenté dans l'étude de Johanson *et al.* (2013), il n'existe aucune information sur la progression de minéralisation des chimères actuelles ; ceci est peut-être due au fait que la minéralisation endosquelettique semble réduite chez ce groupe (Didier, 1995, 2004 ; Stahl, 1967).

Ainsi, ces descriptions concernant la progression de la chondrification et de la minéralisation chez les chondrichthyens, bien que représentant une source d'information importante, ne constituent pas une séquence complète. Le nombre limité de spécimens utilisés ne permet pas de vérifier la présence de variation intraspécifique, et d'obtenir une description détaillée de la progression de la chondrification et de la minéralisation. Ainsi ces informations ne peuvent être utilisées à des fins comparatives que de façon limitée. Afin de pallier à ces lacunes, il est important de caractériser la progression de la minéralisation endosquelettique présente chez un chondrichthyen, afin de valider si celle-ci est similaire à la progression d'ossification présente chez les ostéichthyens. Ceci

permettrait de mieux comprendre les patrons de minéralisation communs à l'ensemble des gnathostomes.

1.3 Objectifs généraux et hypothèses de recherche

Le but de cette recherche est de fournir des données développementales sur les chondrichthyens, non seulement afin de pallier à la paucité de celles-ci, mais aussi afin de les intégrer dans une optique de recherche en Évo-Dévo. Ce manque d'informations sur les processus de chondrification et minéralisation est significatif, car il empêche, entre-autre, la formulation de patrons généraux, l'identification de modules et de régionalisation, et la reconnaissance des conditions basales pour les vertébrés actuels.

1.3.1 Choix des espèces

La première étape de cette recherche consistait à choisir des espèces de chondrichthyens appropriées afin de décrire la progression de la chondrification et de la minéralisation. La chimère-éléphant *Callorhinchus milii* (Holocephali: Callorhinchidae) (Figure 1.5) représente le gnathostome avec l'évolution la plus lente de tous les vertébrés ainsi qu'un des vertébrés avec potentiellement le plus de gènes ancestraux. Cette espèce a été utilisée comme modèle (Gillis *et al.*, 2011 ; Venkatesh *et al.*, 2014) afin de valider les conditions plésiomorphes des gnathostomes actuels; de plus, une apparente similitude est présente dans la composition de l'endosquelette des nageoires pectorales et pelviennes et représente une occasion idéale de comparer les patrons de formations d'éléments afin de vérifier la présence de module. Aussi, les chimères possèdent une région occipitale et une régionalisation de la colonne vertébrale, le synarcuum. Cependant, l'identité des structures composant ces deux régions ainsi que leur progression ontogénétique demeurent inconnues. Cette espèce sera donc utilisée afin d'étudier la séquence de chondrification de l'endosquelette des nageoires paires et de la colonne vertébrale. Pour ce qui est de la séquence de minéralisation, cette espèce ne représente pas un choix optimal puisque la

minéralisation de l'endosquelette est réduite chez les chimères ; cependant, sa progression sera décrite si présente.

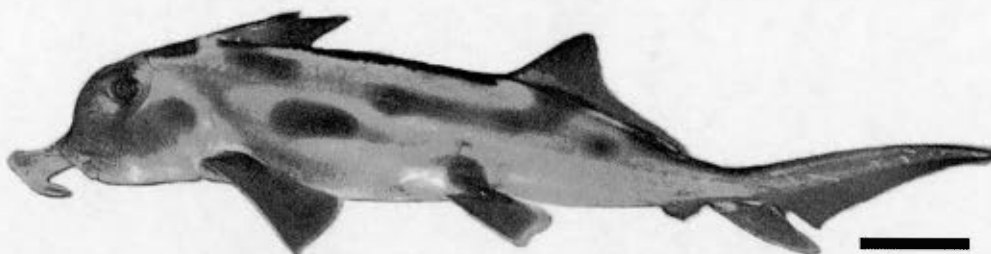


Figure 1.5. Chimère-éléphant *Callorhynchus milii* (femelle adulte). Barre d'échelle : environ 10 cm. Crédit photographique : Aquarium de Melbourne, Australie.

Chez les élamobranques, l'endosquelette de la raie comporte un grand nombre d'éléments, ce qui permet une meilleure visualisation et caractérisation des directions de minéralisation. De plus, les directions de minéralisation qui seront observées en relation avec le synarcuum permettront une comparaison avec celles précédemment décrites. La raie épineuse (*Amblyraja radiata* ; Rajidae ; Batoidea) (Figure. 1.6) est une espèce ovipare, sujette à une pêche commerciale dirigée (Simpson, Miri et Mello, 2012). Un approfondissement de la connaissance des processus développementaux serait donc utile pour mieux connaître cette espèce, afin de mieux comprendre (entre-autre) comment les stress environnementaux pourraient affecter les jeunes stades développementaux, puisque les populations de la côte est du Canada apparaissent être en déclin (McPhie et Campana, 2009 ; Swain et Benoît, 2006). Finalement, les relations phylogénétiques entre les raies ne sont pas encore complètement résolues (Aschliman, Claeson et McEachran, 2012), et la description de nouveaux caractères, tels des caractères développementaux, pourraient aider à une meilleure résolution phylogénétique.

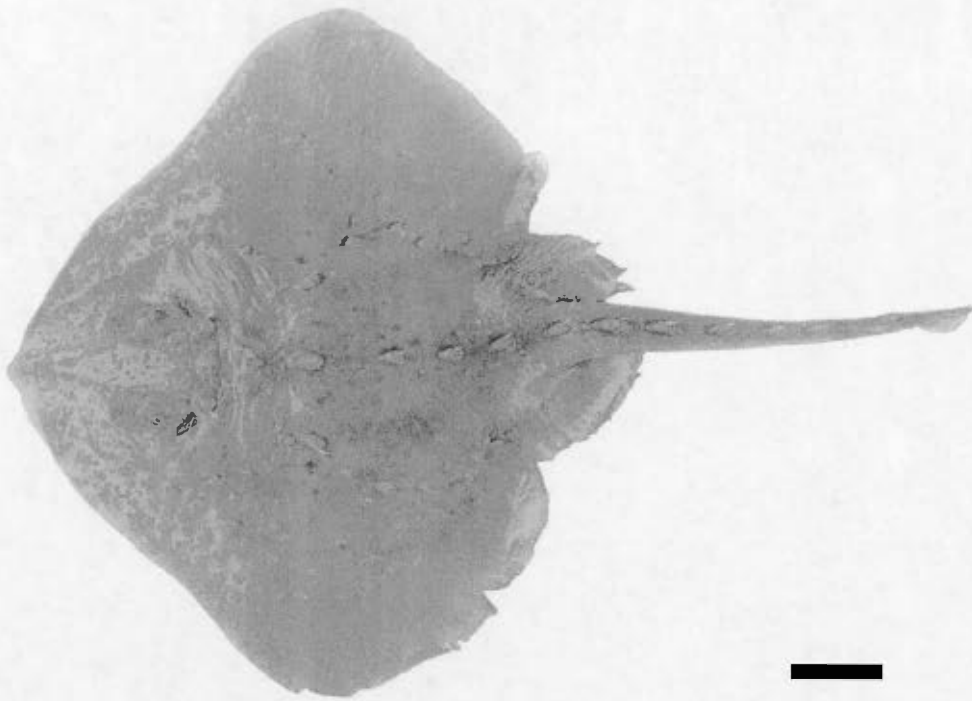


Figure 1.6. Raie épineuse *Amblyraja radiata* (femelle juvénile). Barre d'échelle : environ 1 cm. Crédit photographique : C. Riley

1.3.2 Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif général de cette recherche est de décrire la séquence de chondrification et de minéralisation chez des espèces de chondrichthyens.

Objectif 1 - Description de la morphologie et du développement morphologique des nageoires paires chez Callorhinchus milii

Le but est d'utiliser l'information obtenue afin de valider si les nageoires paires possèdent une morphologie et des patrons développementaux similaires, ce qui devrait être le cas si les nageoires pelviennes sont le résultat d'une duplication des nageoires pectorales. Les données ontogénétiques permettront aussi de vérifier si

le développement des nageoires paires est similaire parmi les chondrichthyens, et de comparer leur progression de chondrification avec celles des ostéichthyens.

Trois hypothèses seront testées :

Hypothèse 1 : la morphologie et le développement des nageoires pectorales et pelviennes démontreront une grande similitude, mais ne seront pas identiques. La prédiction est que leur développement morphologique devrait être similaire, puisque que les patrons moléculaires de développement sont similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes (Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Tamura *et al.*, 2001 ; Tanaka *et al.*, 2002). Une grande similarité dans la morphologie et le patterning sera utilisée comme indicateur de modularité, tel que mentionné par Mabee *et al.* (2002) et Cloutier (2010). Parce que les membres pairs des tétrapodes sont des homologues sériés et des modules morphologiques et développementaux, les nageoires paires, desquelles les membres pairs ont évolués, seront aussi des homologues sériés et des modules morphologiques et développementaux. Ceci dit, des différences au niveau morphologique pourraient cependant être observées entre les nageoires paires, car des différences sont observées entre les membres pairs des tétrapodes (Ouimette *et al.*, 2010).

Hypothèse 2 : le développement des nageoires paires de la chimère sera similaire à celui observé chez les autres espèces de chondrichthyens. Les prédictions, basées sur les observations faites au cours d'études sur d'autre espèces de chondrichthyens (Balfour, 1881 ; Cohn *et al.*, 2002b ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Goodrich, 1906) sont : la plaque mésenchymateuse des nageoires, présente initialement, va se différencier en premier en éléments endosquelettiques, qui vont ensuite se chondrifier suivant une direction proximo-distale, soit les éléments basaux (éléments s'articulant avec la ceinture proximale et les radiaux des nageoires distalement) en premier, puis les radiaux proximaux et les radiaux

distaux en dernier. La chondrification des éléments endosquelettiques va aussi procéder selon une direction antéro-postérieure.

Hypothèse 3 : Les informations obtenues pour les patrons de développement des chondrichthyens seront comparées avec celles disponibles pour les ostéichthyens afin de vérifier si des patrons généraux sont présents. De plus, les patrons généraux et modules communs aux chondrichthyens et aux tétrapodes, et aux chondrichthyens et aux ostéichthyens seront considérés comme plésiomorphes pour les gnathostomes vivants.

Objectif 2 - Description de la morphologie et du développement morphologique de la région occipitale du chondrocrâne et du synarcuum chez Callorhinchus milii

Le deuxième objectif vise à connaître l'identité des structures vertébrales intégrées dans la région occipitale et dans le synarcuum, et de décrire leur formation, afin de vérifier si les éléments vertébraux formés dans la région occipitale du chondrocrâne et ceux formés dans la région du synarcuum sont homologues, de comparer la composition de la région occipitale avec celle des autres espèces de chondrichthyens dans un contexte phylogénétique, et valider si les synarcua présents chez les chimères et les raies sont homologues. Trois hypothèses seront testées :

Hypothèse 1 : Les mêmes éléments vertébraux (basidorsaux, arc neuraux, basiventraux) seront formés le long de l'axe vertébral dans la région occipitale du chondrocrâne et dans la région du synarcuum au début du processus de chondrification. La prédiction est que la morphologie et le développement initial de ces deux régions seront similaires puisqu'elles sont considérées comme homologues (Johanson, Carr et Ritchie, 2010). Le développement tardif sera différent à cause de la formation du synarcuum.

Hypothèse 2 : Les éléments vertébraux présents dans la région occipitale et leur ordre et direction de formation seront les mêmes entre les différentes espèces de chondrichthyens. La prédiction est que l'identité des structures intégrées (arc neuraux, basidorsaux) à la région occipitale du chondrocrâne et le patron de formation seront similaires à celles décrites précédemment chez d'autres espèces de chondrichthyens (de Beer, 1924 ; El-Toubi, 1949 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971).

Hypothèse 3 : Les synarcua des chimères et des raies ne sont pas homologues entre eux (Johanson *et al.*, 2013 ; Stahl, 1967). La prédiction est que les synarcua de *C. milii* et celui présent chez les raies ne seront pas homologues (Johanson, 2010 ; Johanson *et al.*, 2013).

Objectif 3 - Description de la progression ontogénétique de la minéralisation (aréolaire, tesserale) de l'endosquelette complet chez Amblyraja radiata

Le dernier objectif a pour but de caractériser la minéralisation et de décrire le type de minéralisation ainsi que sa direction de progression, afin de vérifier si les types (aréolaire, tesserale), l'ordre, les patrons et les directions de minéralisation sont similaires entre différentes espèces de chondrichthyens, et si ces directions peuvent être comparées à celles observées chez les ostéichthyens. Deux hypothèses seront ensuite testées :

Hypothèse 1 : Les ordres et directions de minéralisation observés à l'intérieur des différents systèmes morphologiques (e.g., chondrocrâne, colonne vertébrale) seront similaires entre espèces de chondrichthyens. Les prédictions sont que la mâchoire sera parmi les premiers éléments à se minéraliser dans le chondrocrâne (Grogan et Yucha, 1999 ; Summers, Ketcham et Rowe, 2004) ; une direction de

minéralisation proximo-distale sera observée pour les nageoires médianes et paires (Schaefer et Summers, 2005) et la progression générale de la minéralisation sera similaire à celle observée chez *S. acanthias* (Benzer, 1944). Le patron de minéralisation concaténée sera observée sur les radiaux des nageoires pectorales, puisque *A. radiata* fait partie de la famille Rajidae, et que les membres de cette famille ont un patron de minéralisation concaténé sur les nageoires pectorales (Schaefer et Summers, 2005).

Hypothèse 2 : Les directions de minéralisation et d'ossification seront différentes entre les chondrichthyens et les ostéichthyens. La prédiction est que les directions de minéralisation observées chez ces deux groupes seront différentes puisque le processus d'ossification endochondrale présent chez les ostéichthyens et de minéralisation (tesserales, aréolaires) présents chez les chondrichthyens sont des processus complètement différents.

1.4 Méthodologie

1.4.1 Matériel

Objectifs 1 et 2

La chimère-éléphant (*Callorhynchus milii*) est un poisson ovipare présent dans tous les océans de l'hémisphère sud sauf l'océan Antarctique (Didier, 2004). Les chimères sont des poissons qui se tiennent généralement à de grandes profondeurs (plus de 500 m), bien que les femelles fréquentent aussi les eaux moins profondes en période de reproduction, lorsqu'elles vont pondre leurs oothèques sur des fonds généralement sablonneux. Leur préférence pour les eaux profondes explique le peu d'information disponible sur leur écologie (Didier, 2004). Cette difficulté

d'accès explique la rareté des études ontogénétiques sur les chimères liée à la difficulté d'accès à des embryons ou des juvéniles (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Gillis *et al.*, 2011). C'est pourquoi les spécimens utilisés dans le cadre de cette recherche ont été empruntés à la collection du Academy of Natural Sciences of Drexel University (ANSP) de Philadelphie, en Pennsylvanie (USA). Ces spécimens avaient été collectés, mesurés (mm) et préparés (double coloration) par Didier (1995) et proviennent de Nouvelle-Zélande, près de Malborough Sound et Dunedin, prélevés en juin 1990. Les spécimens utilisés étaient soit des embryons pêchés dans de leur oothèques, ou des juvéniles nageant librement. Un total de 25 spécimens de la chimère *Callorhinchus milii* a été utilisé afin d'établir une séquence ontogénétique pour décrire la chondrification. L'âge des spécimens n'est pas spécifié car le stade de développement peut varier due à des facteurs environnementaux ou selon la provenance géographique du spécimen, et parce que ces spécimens ont été prélevés en milieu naturel avec aucune façon d'obtenir un âge précis.

Objectif 3

La raie épineuse (*Amblyraja radiata*) est un poisson ovipare d'eau salée présent dans le golfe du St-Laurent ainsi que dans l'océan Atlantique Nord (Cox, Walker et Koop, 1999 ; Swain et Benoît, 2006). Les spécimens utilisés dans le cadre de cette recherche ont été obtenus grâce à une collaboration avec l'institut Maurice Lamontagne (Pêches et Océan Canada). Pendant l'été, l'institut performe une pêche sentinelle dans l'estuaire et le golfe du St-Laurent (mission Teleost), utilisant un chalut afin d'échantillonner un maximum d'organismes ; ces organismes, remontés à la surface rapidement, ne survivent généralement pas à ce stress. Ces pêches sentinelles servent à établir un inventaire des espèces présentes, à établir la condition (quantité, taille, poids) des individus de certaines espèces de poissons, et à faire des prélèvements de tissus pour des recherches ultérieures.

Les spécimens de raies épineuses, ainsi que d'autres espèces (raie lisse, *Malacoraja senta* et aiguillat noir, *Centroscyllium fabricii*) et les oothèques ont été récupérés et placés dans le congélateur à bord du bateau. Ces spécimens ont ensuite été acheminés au laboratoire du Dr. Richard Cloutier (UQAR) et maintenus en état de congélation jusqu'à ce qu'ils soient décongelés afin de les colorer.

Un total de huit embryons, prélevés d'oothèques, et de 14 juvéniles, nageant librement, de *A. radiata* ont été utilisés dans le cadre de cette recherche. Les spécimens utilisés proviennent de différentes missions (2007-2011). La maturité sexuelle chez la population de *A. radiata* présente dans le golfe du St-Laurent est atteinte à une longueur totale de 50 cm pour les mâles et 47 cm pour les femelles (Templeman, 1987) ; les plus longs spécimens mâle et femelle utilisés au cours de cette étude mesuraient 23,3 cm et 21,9 cm respectivement. Tous les spécimens utilisés dans cette étude qui ne provenaient pas d'oothèque et nageaient librement sont catégorisés en tant que juvéniles. Les embryons et juvéniles ont ensuite été placés dans des catégories de développement précoce ou tardive selon la location et quantité de minéralisation du spécimen, afin de faciliter la description de la progression de minéralisation.

1.4.2 Méthodes - Procédures générales

Objectif 1 et 2

Les spécimens de *C. milii* ont été préalablement colorés (Didier, 1995). Les spécimens ont été organisés en stades développementaux croissants (stades 29 à 36) pour obtenir une séquence de développement cohérente. Les spécimens ont ensuite été observés sous stéréomicroscope (Leica M9.5) afin de performer la

prise de données, puis photographiés et dessinés. Les éléments endosquelettiques ont été identifiés et les directions de développement décrites.

Objectif 3

Les spécimens de *A. radiata* et *M. senta* ont été mesurés en premier (longueur totale, largeur du disque), puis colorés et photographiés. Les spécimens ont ensuite été organisés en série de croissance suivant leur largeur afin d'obtenir une séquence de développement cohérente, puis observés sous stéréomicroscope. Un spécimen entier de *A. radiata* a été dessiné à l'aide d'une chambre claire montée sur un stéréomicroscope. Tous les éléments endosquelettiques ont été identifiés, la présence de minéralisation a été caractérisée et les directions de minéralisation ainsi que les particularités de la minéralisation décrites, et ce chez les deux espèces de raies.

1.4.3 Double coloration

Objectif 1 et 2

Le procédé de double coloration a été performé sur les spécimens de *C. milii* par Didier (1995). Ce procédé consiste à teindre le cartilage du squelette en bleue à l'aide de bleue Alcian, et la minéralisation en rouge à l'aide de rouge Alizarin afin de mieux voir les éléments du squelette. Le protocole de double-coloration utilisée par Didier (1995) suit la méthode de Hanken qui est une méthode légèrement modifiée du protocole de Hanken et Wassersug (1981).

Objectif 3

Les spécimens de *A. radiata* et *M. senta* ont été colorés au laboratoire de Richard Cloutier. La double-coloration est une méthode de coloration régulièrement utilisée dans le but de voir les patrons de chondrification et de minéralisation du squelette des vertébrés et est considérée comme la méthode la plus complète (Redfern, Wise et Spence, 2007); jusqu'à présent, aucun autre procédé ne permet une meilleure visualisation du squelette en développement. Cette méthode a été utilisée dans de nombreuses études sur les ostéichthyens pour observer la progression ontogénétique du squelette au cours du développement (Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Mabee, Olmstead et Cubbage, 2000 ; Stewart et Hale, 2012) et sur les chondrichthyens (Eames *et al.*, 2007 ; Gillis, Dahn et Shubin, 2009a ; Schaefer et Summers, 2005).

Il existe plusieurs versions de ce procédé, mais le déroulement général est le même ; celui présentement utilisé provient de Dingerkus et Uhler (1977). Ce procédé implique de placer les spécimens d'animaux frais ou décongelés dans une solution de formol tamponné afin de les fixer, puis dans l'éthanol afin de les déshydrater. Ensuite, les spécimens sont plongés dans une solution d'acide acétique à laquelle est ajouté une teinture d'Alcian bleu (Tétrakis). Le bleu Alcian est une teinture qui se fixe aux glycosaminoglycans du cartilage (Redfern, Wise et Spence, 2007 ; Whiteman, 1973) ; ainsi les éléments de cartilage se teignent en bleue. Après l'étape de coloration du cartilage vient l'étape de neutralisation de la solution acide par une solution de borax. Puis l'étape de digestion des muscles, performée par l'ajout d'une solution de borax additionnée de l'enzyme digestive trypsine, est prolongée jusqu'à ce que les muscles soient suffisamment digérés pour permettre une bonne visualisation du squelette, mais pas trop afin que le spécimen reste complet. Ensuite vient l'étape de la coloration de la minéralisation par la teinture Alizarin (Red S) dans une solution d'hydroxyde de potassium qui teint le

calcium en rouge, qui est utilisée afin de visualiser la minéralisation (Gregory *et al.*, 2004). Le spécimen est ensuite placé dans des bains successifs de solution d'hydroxyde de potassium (KOH) mélangé à de la glycérine. La solution utilisée lors de ces bains comporte une portion décroissante de solution d'hydroxyde de potassium (75%, 50%, 25%) et une portion croissante de glycérine (25%, 50%, 75%) afin de terminer avec le spécimen reposant dans de la glycérine à 100%, où il est entreposé. Quelques cristaux de thymol (antibactérien) sont ensuite ajoutés à la glycérine afin de préserver la qualité du spécimen, et ceux-ci sont placés en storage dans un endroit sombre, car la coloration tends à diminuer d'intensité avec le temps si placés à la lumière vive (R. Cloutier, com. pers.).

1.4.4 Séries ontogénétiques

Les spécimens ont été utilisés afin de reconstruire une séquence ontogénétique ; ces spécimens, aux stades développementaux variés, sont placés en ordre selon un proxy déterminé (taille, âge, stade de développement) (Adriaens et Verraes, 2002 ; Cloutier, 2010 ; Colman and Rowe, 2008 ; Fischer-Rousseau *et al.*, 2009 ; Fuiman, Poling et Higgs, 1998). Il est important d'utiliser le nombre maximal de spécimens disponibles afin de parer à la variation intraspécifique et réduire l'erreur d'échantillonnage (Velhagen, 1997).

Objectifs 1 et 2

Les embryons de *C. milii* ont été ordonnés selon les stades développementaux établis pour cette espèce par Didier *et al.* (1998). Ces tables associent l'apparence de structures morphologiques externes avec la longueur et l'âge des organismes et constitue un système couramment utilisé pour les études biologiques utilisant des spécimens de chondrichthyens (Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993 ; Dahn *et*

al., 2007 ; Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Gillis et Shubin, 2009 ; Luer *et al.*, 2007 ; Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008 ; Wyffels, 2009). Les stades de développement sont considérés comparables entre les requins, raies et chimères, particulièrement en début de développement (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008). Le nombre de structures chondrifiées peut varier à l'intérieur de ces stades, et cette différence est mentionnée dans les études si elle est présente.

Objectif 3

La séquence de minéralisation de *A. radiata* a été obtenue en additionnant le nombre d'événements de minéralisation par spécimen et en les plaçant en ordre croissant. Dans les cas où deux spécimens avaient le même nombre d'événements, leurs rangs respectifs ont été additionnés puis cette somme a été divisée par deux. Les spécimens ont tous deux été attribués à ce même numéro de rang. Afin de déterminer quel paramètre de croissance (longueur totale du spécimen ou largeur du disque) était plus approprié pour établir la série de croissance, un coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé afin de déterminer si le progrès de minéralisation était plus fortement corrélé avec la longueur totale ou la largeur du disque. Un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé sur le nombre d'événements de minéralisation par spécimen afin de vérifier si une différence dans ce nombre existait entre les embryons et les juvéniles. Finalement, une régression linéaire simple a été utilisée afin de décrire la relation entre la longueur totale ($\text{Log}_{10} L_T$) et la largeur du disque transformée ($\text{Log}_{10} D_W$).

1.4.5 Prise et analyse de données

Objectifs 1 et 2

Le squelette entier des spécimens a été observé et photographié en utilisant une caméra digitale montée sur un microscope (stéréomicroscopes modèle Olympus ZH10 et Olympus SZ50). Les photographies ont ensuite été importées dans le logiciel Adobe Photoshop (utilisation des outils luminosité/contraste, exposition et inversion de couleurs), afin d'optimiser la qualité de l'image. Ces photographies ont ensuite été imprimées, et un papier calque transparent a été placé sur ces photographies afin de dessiner avec le plus de précision possible les différentes structures.

Le codage des éléments (0 = élément absent, 1 = élément formé de mésenchyme, 2 = élément dont le contour est en cartilage, 3 = élément fait de cartilage, 4 = minéralisation tesserale, 5 = minéralisation aréolaire) a été fait pour les éléments des nageoires paires, pour tous les stades développementaux. La description de spécimens incomplets repose sur les structures présentes seulement. Les mâles et les femelles n'ont pas été traités séparément car le sexe des spécimens reste inconnu jusqu'à l'apparition des ptérygopodes chez les mâles. Les chimères mâles ont des structures appelées ténacula pré-pelviens incorporées aux ceintures pelviennes, qui servent à agripper les femelles pendant l'accouplement ; cependant, ces structures sont aussi présentes chez les jeunes stades embryonnaires des femelles, et ne peuvent être utilisées afin de sexer les individus (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998).

Les séquences de chondrification (et d'ossification) des espèces vivantes peuvent être décrites en termes de (1) moment de la première apparence d'un élément, (2)

ordre relatif à l'intérieur d'unités morphologiques et (3) directions de formation parmi les éléments sériés à l'intérieur d'unités morphologiques (Cloutier, 2010). La direction du développement progressif des éléments individuels a été évaluée par l'apparition des éléments et leur degré de coloration ; il a été assumé que les structures colorées plus foncées sont apparues avant celles colorées plus pâles pour un même individu.

Ces séquences vont être utilisées afin d'identifier la présence de modules. Une évidence de modules morphologiques sera présente si un critère de similarité phénotypique et topologique (Eble, 2004) est présent entre les nageoires pectorales et pelviennes. Ceci signifie que les nageoires vont devoir démontrer une similarité dans leur anatomie, et que les éléments communs aux nageoires pectorales (e.g., basaux) vont être observés aux mêmes positions respectives dans les nageoires pectorales et pelviennes. Une évidence de modularité développementale va être présente lorsqu'une forte similarité sera observée dans la mise en place des éléments des nageoires paires ; c'est-à-dire que l'ordre d'apparition des éléments et les directions de formation (chondrification, minéralisation) devront être similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes.

Cette méthode a été utilisée lors d'études précédentes pour la caractérisation de modules développementaux (Charest et Cloutier, 2008 ; Goswami, 2007 ; Mabee *et al.*, 2002). Les prémices sur lesquelles la quantification de module chez les chondrichthyens se basent sont que les séquences développementales devraient être congruentes entre les deux nageoires pectorales, entre les deux nageoires pelviennes, et entre les nageoires paires. Ces modules seront décrits avec la séquence d'événements suivant la formation d'éléments de mésenchyme, leur chondrification et subséquente minéralisation. Les modules décrits seront utilisés et placés dans des arbres phylogénétiques déjà publiés, permettant ainsi d'étudier leur trajectoire évolutive. Ceci va aussi permettre d'inférer les trajectoires des

mécanismes évolutifs responsables pour la disparité observée dans les patrons de modularité.

Objectif 3

Les spécimens colorés ont été photographiés et placés sur une table lumineuse afin d'être observés sous un stéréomicroscope (Leica MZ 9.5). Tous les éléments ont été identifiés ; les éléments sériés des nageoires paires et médianes ont été numérotés suivant une direction proximo-distale et antéro-postérieure. Un événement de minéralisation consiste en la présence de minéralisation (tesserale ou aréolaire) sur un élément individuel (e.g., radial), ou en la présence de minéralisation à l'intérieur d'un système morphologique (e.g., nageoire pectorale). Le codage des éléments (0 = élément absent, 1 = élément formé de mésenchyme, 2 = élément dont le contour est en cartilage, 3 = élément fait de cartilage, 4 = minéralisation tesserale, 5 = minéralisation aréolaire) a été fait pour chacun des éléments dans chacun des spécimens.

La séquence de minéralisation est basée sur la présence d'événements successifs de minéralisation, et décrite selon le type, l'ordre d'apparition, le patron de minéralisation, sa distribution et la direction de progression de la minéralisation sur les éléments endosquelettiques. Le type fait référence à la minéralisation tesserale ou aréolaire (Kemp et Westrin, 1979). L'ordre d'apparition fait référence à l'ordre relatif des événements de minéralisation. Le patron de distribution fait référence à la distribution des tesserae sur la surface d'un élément ou d'une structure morphologique (e.g., synarcuum) ; le patron peut avoir une distribution partielle sur un élément (i.e., dorsal, ventral, latéral) ou le recouvrir complètement. La direction de minéralisation (e.g., antéro-postérieur, bidirectionnelle) est inférée à partir de la progression graduelle de la minéralisation d'éléments sériés (e.g.,

radiaux, centra) ou d'un système morphologique (e.g., nageoire pectorale) observé entre les spécimens ordonnés selon un gradient de taille. Les mâles et les femelles n'ont pas été traités séparément.

1.4.6 Nomenclature

Objectifs 1 et 2

L'identification des éléments et leur nomenclature sont basés sur les travaux de Schauinsland (1903) pour les nerfs occipitaux, de Beer (1937) et Didier (1995) pour les structures crâniennes et vertébrales et Didier (1995) pour les nageoires paires. Les éléments qui n'avaient pas été identifiés dans les études précédentes ont été nommés pour cette étude.

Objectif 3

L'identification des éléments et leur nomenclature sont basés sur les travaux de Bustamante *et al.* (2012) pour les éléments crâniens et Claeson (2011) pour le synarcuum. La terminologie des arcs branchiaux est basée selon Gillis *et al.* (2009a) car la morphologie des arcs branchiaux de *A. radiata* est similaire à celle de *Leucoraja erinacea*. La terminologie de l'endosquelette des nageoires pelviennes est basée sur Koester et Spirito (2003) avec une légère modification : le terme "élément" a été remplacé par le terme "segment" afin d'éviter la confusion. La terminologie utilisée pour les autres éléments endosquelettiques est basée sur Compagno (1977, 1999).

1.5 Plan de la thèse

Cette thèse est subdivisée en quatre chapitres et une conclusion générale ; le premier chapitre consiste en une introduction générale (Chapitre I) et les trois autres en chapitres de recherche (Chapitre II-IV). Le deuxième chapitre répond directement aux objectifs généraux en décrivant pour la première fois une séquence de chondrification complète de l'endosquelette des nageoires paires chez un chondrichthyen. Ce chapitre répond à l'objectif 1 en confirmant que le développement des nageoires paires de la chimère-éléphant *C. milli* est similaire au développement observé chez les autres chondrichthyens ainsi que décrit par les études précédentes. Les nageoires paires de la chimère démontrent une très grande similitude dans leur morphologie et leur développement, ce qui apporte un appui important en la faveur de l'hypothèse de la duplication des nageoires pectorales et au re-déploiement des processus développementaux en une position postérieure, donnant lieu aux nageoires pelviennes.

De plus, cette forte similitude dans la morphologie et le patterning des éléments suggère la présence de modules morphologiques et développementaux chez les nageoires paires, ce qui représente le premier module à être décrit chez un chondrichthyen à l'aide d'une série ontogénétique, et le premier concernant les nageoires paires des poissons. Finalement, la présence de modules chez les nageoires paires et membres pairs, ainsi qu'une direction de formation antéro-postérieure et proximo-distale représentent des conditions plésiomorphes aux gnathostomes actuels. Ce chapitre est un manuscrit en préparation en voie d'être soumis au *Journal of Anatomy*.

Le troisième chapitre répond directement aux objectifs généraux en décrivant pour la première fois une séquence de chondrification complète de l'endosquelette de la région occipitale du chondrocrâne, de la région antérieure de la colonne vertébrale

et du synarcuum chez un chondrichthyen. Ce chapitre répond à l'objectif 2 en décrivant l'anatomie et le développement de la région occipitale du chondrocrâne et au synarcuum, et en décrivant leur formation. Aucun élément vertébral n'a été observé incorporé dans la partie occipitale, celle-ci étant formée seulement par les parachordaux. La disparité morphologique entre les régions occipitale et synarcuale augmente au cours du développement. Ainsi, bien que provenant de sclérotomes sériés homologues, la composition et le développement de la région occipitale du chondrocrâne et de la région antérieure de la colonne vertébrale sont différents. Le nombre et l'identité des éléments incorporés dans la région occipitale des chondrichthyens varient grandement entre espèces. Finalement, il est démontré que, bien que constitués de plusieurs éléments vertébraux homologues, les synarcua des chimères et des raies ne sont pas homologues car ils possèdent des patrons de formation différents ainsi que des éléments endosquelettiques non-homologues, spécifiques à chacun des groupes. Ce deuxième chapitre est un manuscrit en préparation afin d'être soumis au *Journal of Morphology*

Le quatrième chapitre répond directement aux objectifs généraux en décrivant pour la première fois une séquence de minéralisation complète de l'endosquelette entier chez un chondrichthyen. Ce chapitre répond à l'objectif 3 en décrivant pour la première fois les types, patrons, distributions et directions de minéralisation chez la raie épineuse. La distinction entre les patrons de minéralisation crustale et caténée n'est pas toujours évidente puisqu'il s'agit du même type de minéralisation (tessérale) répartie de façon différente sur les éléments endosquelettiques, et que la progression de minéralisation rend les deux formes parfois difficiles à distinguer l'une de l'autre. Les types, patrons, distributions et directions de minéralisation observés chez la raie épineuse sont généralement similaires à ceux décrits pour les autres espèces de chondrichthyens, sauf pour un léger retard au niveau de la mâchoire comparée aux autres éléments associés au

chondrocrâne. Les directions de minéralisation, similaires entre chondrichthyens, sont comparées aux ostéichthyens, qui démontrent une grande variabilité interspécifique. Cependant, certaines directions d'ossification (ostéichthyens) et de minéralisation (chondrichthyens) sont similaires entre ces deux groupes, tels une direction proximo-distale pour les nageoires paires, et bidirectionnelle pour la colonne vertébrale et la deuxième nageoire dorsale. Ces directions pourraient donc représenter des conditions plésiomorphes pour les gnathostomes. Ce troisième chapitre est un manuscrit en préparation pour le *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*.

CHAPITRE II

CHIMAERID PAIRED FIN PATTERNING : SERIAL HOMOLOGUES AND MODULES

Cyrena Riley¹, Richard Cloutier¹, et Eileen D. Grogan²

Affiliation :

¹ Laboratoire de Biologie évolutive, Université du Québec à Rimouski, Rimouski,
Québec, G5L 3A1

² Department of Biology, St-Joseph's University, Philadelphia, Pennsylvania,
19131-1395

Contribution des co-auteurs (initiales)

Mise en place du protocole expérimental (CR, RC, EDG)

Récolte des données (CR)

Analyse des données (CR, RC)

Interprétation des résultats (CR, RC, EDG)

Rédaction du manuscrit (CR)

Corrections et commentaires du manuscrit (RC, EDG)

Financement (RC)

Résumé

La transition d'une seule paire de nageoires (nageoires pectorales) vers la condition où deux paires de nageoires paires (nageoires pectorales et pelviennes) sont présentes est, comparativement à la transition des nageoires paires vers les membres des tétrapodes, un événement évolutif peu documenté. Tout comme les membres paires, les nageoires paires sont considérés homologues sériés, et l'origine des nageoires pelviennes a été suggéré comme le résultat d'une duplication des mécanismes génétiques présents au niveau des nageoires pectorales, mais re-localisés postérieurement. Cependant, peu d'études se sont penchées sur ces hypothèses. Ainsi, le principal objectif de la présente étude est de vérifier si la morphologie et le développement étaient similaires entre les nageoires pectorales et pelviennes chez une forme de gnathostomes basales. Une forte similarité pourrait corroborer que les nageoires paires sont des homologues sériés possiblement issue d'un événement de duplication. Le développement des nageoires paires chez la chimère-éléphant *Callorhinchus milii* a été utilisé afin de comparer cette similarité appendiculaire. Une forte similarité dans la morphologie et la progression de la chondrification entre les nageoires pectorales et pelviennes a été observée, suggérant que celles-ci représentent des homologues sériés issus d'une duplication. De plus, cette similarité morphologique et développementale suggère la présence de modules morphologiques et développementaux chez les nageoires paires, ainsi qu'observé chez les membres paires. La progression de la chondrification des nageoires paires de *C. milii* est similaire à celle des autres chondrichthyens. Des similitudes de directions développementales existent entre les chondrichthyens et les ostéichthyens, suggérant un partage phylogénétique de patrons.

Mots-clefs

Nageoires paires, homologie sériée, duplication, *Callorhinchus milii*, chondrification, chondrichthyens

Abstract

The transition from a single set of paired fins (pectoral fins) to the condition where two pairs of fins are present (pectoral and pelvic fins) is, compared to the transition of fins to limbs, a much less investigated evolutionary event. As paired limbs, paired fins are purported serial homologues, and the advent of pelvic fins has been hypothesized as resulting from a duplication of the genetic mechanisms present in the pectoral fins but re-iterated at a more posterior location. However, few studies have verified this possibility. Thus, the main objective of this study is to investigate whether morphology and development are similar between pectoral and pelvic fins in a basal gnathostome; a strong similarity could corroborate that paired fins are serial homologues having arisen through a duplication event. Paired fin development in the chimaerid fish *Callorhinchus milii* was used to investigate this appendicular similarity. A strong similarity in the morphology and progression of chondrification between the pectoral and pelvic fins in this species was found, suggesting that these represent serial homologues that could have arisen by duplication. Furthermore, this high degree of morphological and developmental similarity suggests the presence of morphological and developmental modules within paired fins, as observed in paired limbs. Progression of chondrification in the paired fins of *C. milii* was also similar to what was observed in other chondrichthyan species. Similarities in developmental directions exist between chondrichthyans and osteichthyans, suggesting shared phylogenetic patterns.

Keywords:

Paired fins, serial homology, duplication, *Callorhinchus milii*, chondrification, chondrichthyans

2.1 Introduction

The development and morphology of vertebrate paired appendages (fins, limbs) have been intensively investigated by evolutionary developmental biology studies (Onimaru *et al.*, 2011 ; Shubin, 1995 ; 2012). Among recent taxa, the paired pectoral and pelvic fins of chondrichthyans (sharks, skates, rays and chimaerids) and actinopterygians (bichirs, sturgeons, gars, bowfins, teleosts) are homologous between themselves and to the forelimbs and hindlimbs of tetrapods, respectively (Coates, 1994 ; Don, Currie et Cole, 2013 ; Shubin, Tabin et Carroll, 1997). Paired appendages (fins and limbs) are therefore considered serially homologous structures (Abbasi, 2011 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Shubin, Tabin et Carroll, 1997), which implies a similarity in the developmental mechanisms responsible for their patterning (Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Iber et Zeller, 2012 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Sordino, van der Hoeven et Duboule, 1995 ; Tanaka *et al.*, 2002 ; Tanaka et Tickle, 2007 ; Yano et Tamura, 2013).

This presence of two sets of paired fins is a characteristic of gnathostomes that originated from the basal-most gnathostomes, at the Ordovician-Silurian boundary (Zhu *et al.*, 2012), some 444 mya (Walker et Geissman, 2009). Furthermore, it is well accepted that modifications of the paired fins of sarcopterygian fish during the Upper Devonian, some 380 mya, resulted into tetrapod limbs (Coates et Ruta, 2007 ; Cohn *et al.*, 2002b ; Shubin, 1995). Therefore, although the transition from fins to limbs is well documented, other pivotal events in gnathostome evolution remain unresolved and understudied: (1) the origin of paired fins (Cole et Currie, 2007 ; Gillis, Dahn et Shubin, 2009b ; Wilson, Märss et Hanke, 2007) and (2) whether pelvic fins are the result of a duplication of pectoral fins (Don, Currie et Cole, 2013 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Several scenarios, based on morphological and molecular data, have been proposed to explain the transition from one set of paired appendages (pectoral fins) to two sets (pectoral and pelvic

fins). The best-known hypotheses based on the modification of pre-existing structures are the gill arch theory (Gegenbaur, 1878) and the finfold theory (Balfour, 1881 ; Mivart, 1879 ; Thatcher, 1877). The gill arch theory suggests that the paired appendages of gnathostomes arose from modification of a gill arch, whereas the finfold theory suggests that paired appendages are the result of the subdivision of a continuous finfold into two distinct finfolds, and separated into an anterior and a posterior parts.

Although these early studies were considered flawed (Coates, 2003 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000), they were recently re-examined using molecular developmental pathways in elasmobranchs. Gillis *et al.* (2009) demonstrated that elements of the branchial skeleton and paired appendages in the little skate (*Leucoraja erinacea*) retained similar regulatory and structural components, corroborating the gill arch theory. Tanaka *et al.* (2002) did not find morphological evidence of a lateral finfold in embryos of the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Therefore, there is evidence of developmental similarities between paired appendages and gill arches, but so is there between the molecular developmental patterns of median and paired fins (Freitas *et al.* 2006).

However, the observed expression of limb specification genes led to the proposal that an ancestral vertebrate might have had a single median finfold with a single cluster of regulatory T-box genes (cluster *Tbx4/5*) spanning its length, which was then duplicated (Tanaka *et al.*, 2002). These regulatory genes were then expressed singly within the pectoral and pelvic fins (*Tbx5* and *Tbx4*, respectively). Horton *et al.* (2008) proposed that pectoral fins arose from the lateral expression of the single cluster of regulatory genes (*Tbx4/5*) and caudal transposition of this lateral expression resulted into the development of pelvic fins. The hypotheses proposed by Tanaka *et al.* (2002) and Horton *et al.* (2008) were based respectively on modifications of the « genes before fins » and « fins before genes » scenarios

proposed by Ruvinsky and Gibson-Brown (2000).

Both scenarios suppose that a fin-less ancestor had a single cluster of regulatory genes (*Tbx4/5*), which acquired a novel domain of expression, resulting in the formation of the pectoral fins in which both genes were expressed. The « genes before fins » model supposed that the T-box gene cluster underwent duplication and that *Tbx4* acquired a novel expression domain, resulting in the formation of pelvic fins. The « fins before genes » model supposed the presence of both pectoral and pelvic fins before gene cluster duplication, with both fins expressing the *Tbx4* and *Tbx5* genes (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Pelvic fins were the result of the cluster acquiring a novel expression domain, and eventually divergent evolution resulted in the *Tbx5* being expressed in pectoral fins and *Tbx4* in pelvic fins only. The significant point in both scenarios is that anterior appendages (pectoral fins) were assembled first, and then reiterated posteriorly (pelvic fins), making them serial homologues (Ruvinski et Gibson-Brown, 2000).

Minguillon *et al.* (2009) observed that limb outgrowth could be initiated in mice by the single gene cluster *AmphiTbx4/5*, found in the limbless *Amphioxus*; limb formation in *Amphioxus* is not possible because the genomic locus is missing the regulatory modules for limb outgrowth (Minguillon *et al.*, 2009). Minguillon *et al.* (2009) suggested that it was probably a modification of *Tbx5* and *Tbx4* regulation expression rather than the generation of novel protein function that resulted in the appearance of paired appendages. The « pelvic before pectoral fins » model (Tabin et Laufer, 1993) was suggested following the observation that only the posterior Hox genes are expressed during the formation of appendages; it was hypothesized that re-deployment of the posterior Hox gene expression into an anterior location gave rise to the pectoral fins.

Freitas *et al.* (2007) suggested that paired fins arose from a reiteration and

repositioning of mechanisms already present in median fin development, suggesting that all fins are serial homologues (Cole et Currie, 2007). Subsequently, Johanson (2010) proposed a scenario in which a dorsal zone of competence was present at first in a basal appendage-less vertebrate, and from this zone of competence, fins supported by radials originated. This zone was then duplicated and co-opted to a novel area along the flank; eventually this zone of competence shifted to the lateral plate mesoderm which produced fin buds and endoskeletal structures in the pectoral region first.

Based on fossil evidence (Coates, 2003 ; Coates et Cohn, 1998, 1999 ; Janvier, Arsenault et Desbiens, 2004 ; Thorogood et Ferretti, 1993), pectoral fins are said to have evolved before pelvic fins, before the origin of gnathostomes, although there is still some contention (Wilson, Märss et Hanke, 2007). The origin of pelvic fins thus implies the reiteration of the developmental processes used for producing pectoral fins, making paired fins serial homologues; following this hypothesis the morphology and development of pectoral and pelvic fins should be similar.

Although molecular evidence supports the shared phenotype and development of paired appendages, fundamental morphological information is still lacking, even though morphogenesis can provide valuable information on the origin and evolution of structures (Tamura *et al.*, 2001). This is unfortunate, since developmental morphology is essential to provide a fundamental framework upon which molecular evidence can be mapped. This framework can be obtained from the study of sequences of chondrification and mineralization, which can be used to infer evolutionary developmental patterns and processes (Cloutier *et al.*, 2010). These should ideally come from size series of fossils, since a phylogenetically basal gnathostomes such as placoderms may be more likely to have retained the basal fin condition than a highly derived group such as teleosts, which can exhibit extremely diverse appendage morphology (Coates, 2003). Unfortunately, early

developmental stages of fossil species often do not retain the ontogenetic development of paired fins, since embryonic endoskeletal structures in gnathostomes usually consist of cartilage, which does not preserve well (Cloutier, 2010 ; Coates, 1994 ; Lund et Grogan, 1997 ; Raff, 2007). Therefore using a size series from a fossil placoderm species would be ideal, but as of now, there are none available with paired fin ontogenetic data, making this not possible.

The next basalmost phylogenetic group after placoderms are chondrichthyans (of which the Paleozoic forms include paleoselachians and holocephalans); but for the same reasons as those mentioned above, fossil size series with well-preserved paired fin structures are unknown. Therefore the use of a size series from a fossil chondrichthyan species is not currently possible. However, the general growth patterns observed in actinopterygian and sarcopterygian fossil species do not appear to differ radically from those found in extant species (Cloutier, 2010); this may also be the case for chondrichthyan species. Thus, because of the lack of information on the development of paired fins in more phylogenetically basal fossil taxa such as placoderms, the study of paired fin development within living phylogenetically basal taxa is necessary in order to establish plesiomorphic conditions within extant species. Chondrichthyans are also considered phylogenetically less derived compared to osteichthyans (Cole et Currie, 2007 ; Venkatesh *et al.*, 2007) and crucial to the study of evolutionary developmental mechanisms (Cole et Currie, 2007 ; Dahn *et al.*, 2007 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Robinson-Rechavi, Boussau et Laudet, 2004 ; Wourms, 1981).

Despite the fact that chondrichthyan species have been used as research organisms for centuries (Cole et Currie, 2007 ; Wourms, 1997) and as the topic of several studies on fin embryology and development (Balfour, 1881 ; Goodrich, 1906 ; Tanaka *et al.*, 2002), there is still no description of a complete developmental sequence of paired fins for this group. The morphology of chondrichthyan paired

fins is generally accepted as reflecting a basal gnathostome condition compared to osteichthyans (Cole et Currie, 2007 ; Tamura *et al.*, 2001 ; Tanaka *et al.*, 2002), although there is some contention over this (Coates, 2003). Nevertheless, the fact that they are gnathostomes of ancient lineage with both pectoral and pelvic fins makes them ideal models for studies on the evolution of paired appendages (Cole et Currie, 2007).

In living elasmobranchs (sharks, skates and rays), a pectoral fin with three basal elements (i.e., propterygium, mesopterygium, metapterygium) is considered the plesiomorphic condition (Compagno, 1999 ; Mabee, 2000). However, due to poorly resolved phylogenetic relationships of fossil taxa, it is uncertain whether this tribasal condition is plesiomorphic for extant and extinct chondrichthyans (Davis, Shubin et Force, 2004 ; de Carvalho, 1996 ; Mabee, 2000 ; Maisey, 1984 ; Rosen *et al.*, 1981). As for pelvic fins, these are modified compared to pectoral fins since they possess a basipterygium and male reproductive structures called claspers (Compagno, 1977; Didier, 1995; Grogan et Lund, 2004). Because of the diverging morphology between pectoral and pelvic fins within species, and different fin morphology among species, chondrichthyans have often been overlooked in morphological studies of paired fins. Indeed, osteichthyans have been preferred, even though pectoral and pelvic fins in some species have different morphologies and developmental patterns (Coates, 2003 ; Wagner et Larsson, 2007).

Despite the fact that chondrichthyans were often ignored for paired fins morphological studies in the past, chimaeras offer a unique opportunity to investigate morphological development of paired fins. Within the oldest and most basal chimaera family, the Callorhynchidae (Didier, 1995; Heinicke, Naylor et Hedges, 2009 ; Inoue *et al.*, 2010), extant species exhibit gross skeletal similarity between the pectoral and pelvic fins (Didier, 1995), thus allowing for anatomical

and developmental comparisons. The general endoskeletal pattern of pectoral fins of chimaeras dates back from the Middle Jurassic (Stahl, 1999). This morphological conservatism may indicate a stability in fin patterning through time within this group, since the genome of chimaeras appears to have retained a greater number of ancestral genes compared to osteichthyans (Inoue *et al.*, 2010 ; Larsson *et al.*, 2009 ; Ravi *et al.*, 2013 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Yu *et al.*, 2008). Chimaeras were also found to have a basal position within the Chondrichthyes (Chen *et al.*, 2012) and thus are ideal chondrichthyans in which to investigate development, especially since there is a need for greater embryological information concerning this group (Pradel *et al.*, 2011). A growth series of *Callorhinchus milii* (Callorhinchidae) is available, thus rendering the study of development of their paired fins possible.

The main goal of this study is to provide a description of the morphology and chondrification and mineralization patterns of the pectoral and pelvic fins of *Callorhinchus milii*. The first objective is to use this information to verify whether pectoral and pelvic fins have similar morphology and similar chondrification and mineralization patterns, since this should be the case if pelvic fins are the result of a duplicational event of the pectoral fins. Identical patterning between paired fins is not expected since even though the genes responsible for appendage outgrowth and axis formation (among others) are fundamentally shared, changes (addition, deletion) in the developmental pathway can produce variations (morphological, developmental) in homologous structures (Hall, 1995b ; Young et Hallgrímsson, 2005). The second objective is to compare the ontogenetic data obtained from this description with that available for other chondrichthyan species in order to see whether general trends are present, and then to compare these chondrichthyan trends to those present in osteichthyans, in order to establish generalized patterns and infer plesiomorphic conditions for extant gnathostomes.

2.2 Material and Methods

A total of 23 cleared and doubled-stained embryos (Didier, 1995) of *Callorhinchus milii* (Holocephali: Callorhinchidae) from the Academy of Natural Science of Philadelphia of Drexel University (ANSP), Pennsylvania (USA) were used for this study. Specimens were observed and photographed using a digital camera mounted on a microscope (Olympus ZH10 research stereomicroscope and Olympus SZ50 dissecting scope). These photographs were then adjusted with filtering tools (brightness/contrast, exposure and invert colors) in Adobe Photoshop in order to display structures optimally. Drawings were made from the photographs. Description focuses on pectoral and pelvic endoskeletal elements in specimens ranging from embryo stage 29-36 and hatchlings.

The sequence of skeletal element formation was ascertained by their ontogenetic appearance in relation to other skeletal elements (Cloutier, 2010). This sequence was also used to assess directionality in fin development, along with the degree of staining; elements that were more darkly stained were inferred to have appeared before lightly-stained ones in a given specimen. Terminology follows Didier (1995); structures that were not identified previously are named herein. The developmental stages (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998), ANSP catalog numbers, total lengths and sex of specimens indicated for specimens are presented in Table 2.1.

Table 2.1. Stage, ANSP catalog number, total length (mm) and sex of *C. milii* specimens

Stage	ANSP catalog number	Total length (mm)	Sex
29	174694	56.25	Undetermined
29	174695	62.10	Undetermined
29	174690	66.75	Undetermined
30	174667	69	Undetermined
30	174665	69.3	Undetermined
30	174658	69.5	Undetermined
30	174656	71.95	Undetermined
31	174693	72.75	Undetermined
31	174689	79.3	Undetermined
31	174661	79.4	Undetermined
32	174696	74.05	Undetermined
32	174688	75.90	Undetermined
33	174659	78.7	Undetermined
33	174682	80.97	Undetermined
33	174691	83.6	Undetermined
34	174711	87	Undetermined
34	174692	89	Undetermined
34	174712	98	Undetermined
35	174663	95	Male
35	174674	100	Female
35	174687	101.6	Male
35	174653	103.85	Male
36	174675	110	Male
Hatch	174714	166	Undetermined
Hatch	174713	205	Undetermined

2.3 Results

General morphology

In *C. milii*, the pectoral fin of the adult consists of two proximal basal elements (propterygium and metapterygium) that articulate distally with numerous radials, whereas the pelvic fin consists of a single basal element (basipterygium, including the metapterygium) articulating distally with numerous radials (Didier, 1995). In chondrichthyans, a metapterygial axis is present in the paired fins, and this is modified into claspers in male pelvic fins (Compagno, 1977).

Progression of development

The pectoral fins of stage-29 specimens are becoming distinct from the lateral finfold and have a rounded shape. The anterior limit of the fins is at the level of the fifth branchial arch, whereas the posterior limit appears to be slightly posterior to the anterior level of the median finfold. A maximum of 25 small unstained individual mesenchymatous rods span the entire length of the fins, their distal extremities are enlarged and rounded. These rods are lined next to one another in a slight inward curve. All rods have similar width, but rods placed at the anterior and posterior limits of the fins are smaller compared to those in the middle. There is no evidence (mesenchyme or cartilage) of the presence of the pectoral girdle and basal elements.

In the pelvic fins of stage-29 specimens, the general external appearance of the pelvic fins is similar to that of the pectoral fins. A maximum of 19 mesenchymatous rods are present, with those located at the anterior and posterior limits of the fins nearly half the length of those in the middle. Their alignment, however, is less curved than those observed in the pectoral fins. In the longest specimen, ANSP 174690, rods are longer and thinner than those observed in the

two smaller specimens from the same stage. There is no evidence (mesenchyme or cartilage) of the presence of the pelvic girdle and basipterygium.

Stage-30 specimens have their pectoral fins damaged and little information can be retrieved except from specimen ANSP 174667. In this specimen, the propterygium and the metapterygium are lightly stained as cartilaginous structures, but no mesenchymatous rods can be seen. The propterygium appears as a rounded structure in the proximal region of the fins, anteriorly positioned to the metapterygium, and articulates with the coracoid. The metapterygium is present posteriorly as an elongated structure within the median region of the fin, and also articulates with the coracoid. Thus, both the propterygium and metapterygium articulate with the coracoid at this stage. The ceratotrichia are present along the lateral edge of the pectoral fins. The pelvic fins are too damaged for analysis.

Stage-31 specimens have their basal elements more fully developed and darkly-stained than stage-30 specimens (Figures 2.1A, 2.2A). The propterygium is triangular and is located proximal to the metapterygium. The proximal edge of the propterygium articulates with the coracoid, the postero-medial edge with the anterior edge of the metapterygium and its postero-lateral edge with the fused proximal extremities of radials 1-2. An elongated structure is present lateral to the wider metapterygium (Figures 2.1A, 2.2A). This element could be interpreted either as a lateral process of the metapterygium, or as a distinct basal, the mesopterygium; herein, it is interpreted as being part of the metapterygium. The lateral process of the metapterygium is beginning to fuse with the metapterygium in a proximo-distal direction. The proximal extremity of the metapterygium also articulates with the coracoid (Figure 2.2A). In the longest stage-31 specimen (ANSP 174661; Figure 2.1A), a rounded element distal to the metapterygium is present; this element is darkly stained and appears to be separate from the

metapterygium. Because of its position along the metapterygial axis, this structure is interpreted as the first metapterygial segment.

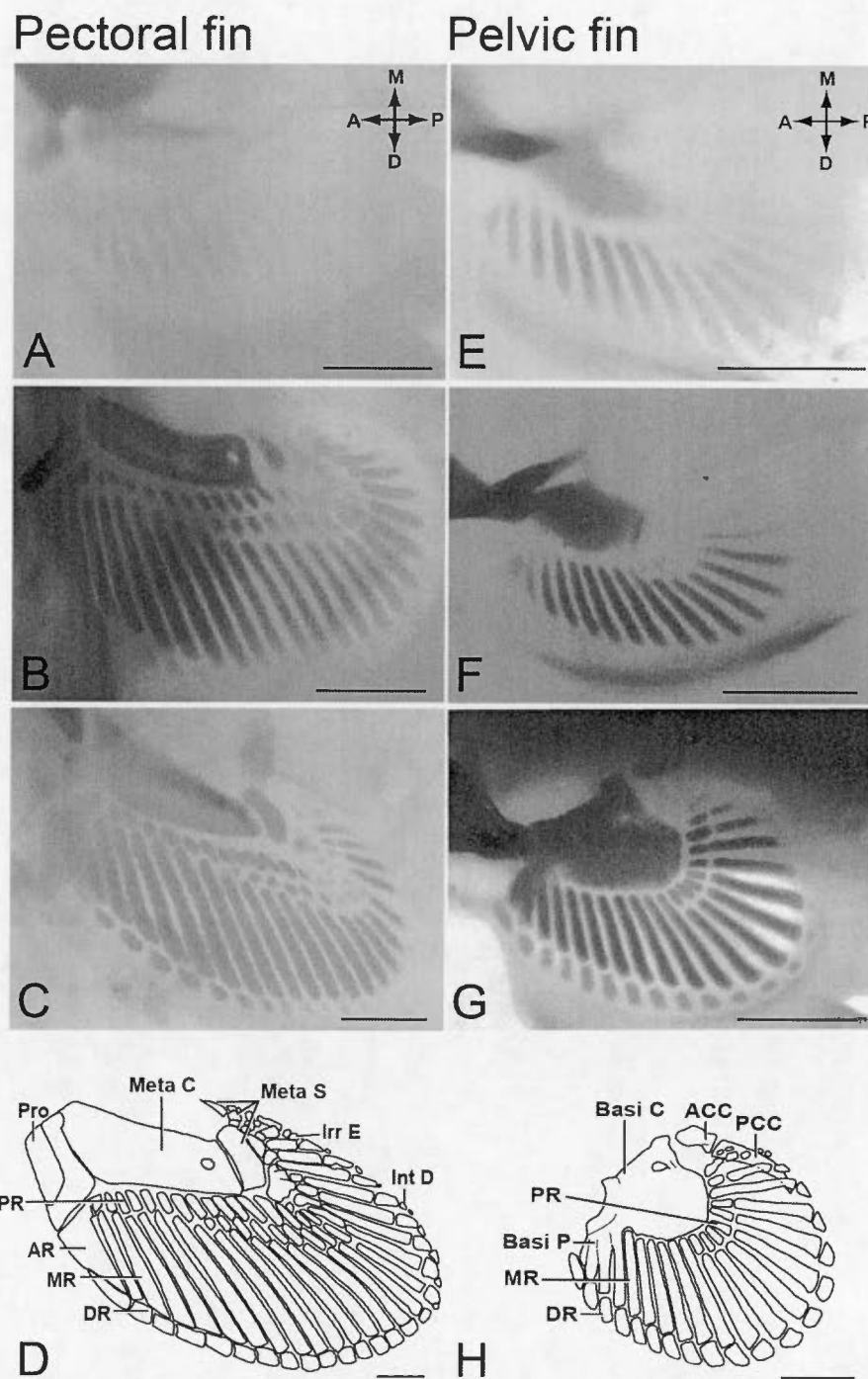


Figure 2.1. Order and direction of chondrification of basal and radial elements in *C. milii* paired fins. A-D, pectoral fins; E-H pelvic fins. (Continued on next page).

Figure 2.1. (Continued). A. specimen ANSP 174661, Stage 31. B. ANSP 174688, stage 32. C. ANSP 174691, stage 33. D. Pectoral fin of ANSP 174675, stage 36. E. ANSP 174688, stage 32. F. ANSP 174682, stage 33. G. ANSP 174692, stage 34. H. Pelvic fin of ANSP 174675, stage 36. ACC: anterior clasper cartilage; AR: anterior radial element; Basi C: basipterygial complex; Basi P: basipterygial process; DR: distal radials; Meta C: metapterygial complex; Meta S: metapterygial segments; MR: middle radials; PCC: posterior clasper cartilage; PR: proximal radials; Pro: propterygium. All specimens are cleared and stained; cartilages are stained in blue. Scale bar: 1mm.

The first row of proximal and middle radials are chondrified. These radials chondrify sequentially from the mesenchymatous rods, where mesenchymal rod 1 gives rise to proximal and middle radials 1. Middle radials are present as elongated rectangular structures. They chondrify following an antero-posterior direction (Figure. 2.1A), with those placed anteriorly more darkly stained and better defined than those in the middle; as for the posterior rods, they are still mesenchymatous but are beginning to chondrify from the middle portion of the rod. The first two middle radials are smaller and fused proximally, forming the proximal region of the anterior radial element. The proximal radials articulate with the lateral edge of the metapterygial process. These radials are slightly squarish and also chondrify following an antero-posterior direction. Proximal radials are less advanced in their chondrification compared to middle radials. Distal radials are beginning to chondrify.

Within the pelvic fins of the longest stage-31 specimen (ANSP 174661), a cartilaginous mass is forming, near the ventral edge of the pelvic girdle. This mass could be interpreted as a single basal (the metapterygium) with a lateral process or as two cartilaginous basals (mesopterygium and metapterygium); presently, it is interpreted as the former. The metapterygium and its lateral process are darkly-stained anteriorly. The lateral process is elongated and articulates with the mesenchymatous rods. Similarly to the condition observed within the pectoral

fins, basal elements chondrify before radials. The middle radials are long and thin, with rods 1-3 shorter than the subsequent ones and the whole rod assemblage ressembling the crescent-shaped configuration observed in pectoral fins of stage-29 specimens.

The pectoral fins of stage-32 specimens exhibit marked differences in their state of development. Mesenchymatous rods within the smallest one (ANSP 174696) are lightly stained, with radials starting to differentiate from these rods, whereas the largest specimen shows a much more advanced state of development, with new elements present (Figure 2.1B). However, both specimens display a propterygium that has a large notch marking the lateral edge; the distal edge is concave and articulates with the forming anterior radial element. The propterygium and the metapterygium are closer to the coracoid; the proximal edge of the metapterygium is slightly concave in order to articulate with the coracoid (Figures 2.1B, 2.2B). The progressive condensation and differentiation of the metapterygium and its lateral process is continuing further distally. In addition, the fins of the largest specimen (ANSP 174688) have a propterygium with a thick ridge on its lateral edge (Figure 2.1B). The space between the metapterygium and its lateral process has greatly diminished and their distal regions have fused together. The first metapterygial segment has also fused with the distal edge of the metapterygium, with the fenestra remaining between them marking the position of their original separation (Figure 2.1B).

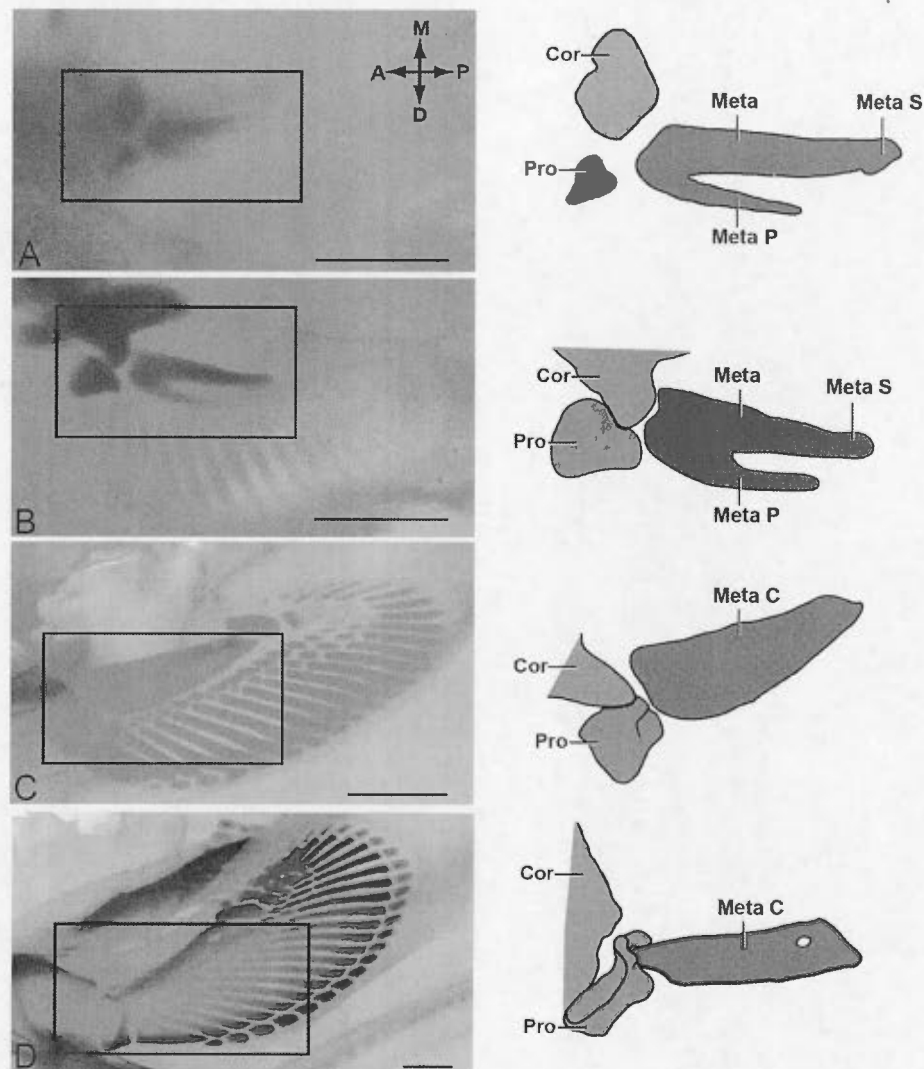


Figure 2.2. Pectoral fin configuration of coracoid, propterygium and metapterygium during different embryological stages of *C. milii*. A. ANSP 174693, stage 31. B. ANSP 174696, stage 32. C. ANSP 174682, stage 33. D. ANSP 174663, stage 35. Cor: coracoid; Meta: metapterygium; Meta C: metapterygial complex; Meta P: metapterygial process; Meta S: metapterygial segment; Pro: propterygium. Scale bar: 1mm.

Therefore, the metapterygial complex (metapterygium, lateral process, first metapterygial segment) now forms a single structure, with a fenestrae remaining distally. A new element is present distally, which is interpreted as a second metapterygial segment based on its position within the metapterygial axis. This segment is similar to the first metapterygial segment, crescent-shaped and longer than wide. The concave proximal edge of the second metapterygial segment articulates with the distal edge of the metapterygial complex. All radials present are more darkly stained in the anterior part of the fin than in the posterior part (Figures 2.1B, 2.2B). There are now 27 middle radials present. Nearly all first row proximal radials are present, and a second row of proximal radials has formed between the first row of proximal radials and the middle radials. The formation of the anterior radial element is progressing, with the first two middle radials fused together with the first four proximal radials; the proximal extremity of middle radial 3 fuses with proximal radial 3. Distal radials 2-8 are present, but are very lightly stained. All radials (proximal, middle, distal) appear following an antero-posterior direction of formation (Figure 2.1B).

Structures within the pelvic fins of the smallest stage-32 specimen (ANSP 174696) are also in a less advanced state of development, with mesenchymatous rods present abutting one another, their length gradually increasing from anterior to posterior. Within the pelvic fins of the largest specimen (ANSP 174688), both the metapterygium and its lateral process have elongated proximo-distally, and their proximal extremities are fused together, creating a metapterygial complex (Figure 2.1E). A rounded cartilaginous knob is present distally to the metapterygial complex, and is interpreted as the first metapterygial segment. The distal edge of the metapterygial complex has ridges articulating with the adjoining middle and proximal radials. Middle radial 1 is wider, and middle radials 2-8 are more darkly stained. Middle radial 1-3 are starting to fuse at their proximal extremities and with the anterior edge of the metapterygial complex,

forming the basipterygial process. Lightly-stained proximal radials, located in the middle part of the fin, are chondrifying. The original mesenchymatous rods from which the radials chondrify can still be observed associated with middle radials 9-14, and proximal and middle radials are still united by mesenchymatous bridges.

At stage 33, there is still a marked difference in the state of development of fins among specimens. The pectoral fins of the smallest specimen (ANSP 174659) are in a less advanced state of development than specimen ANSP 174688 (stage 32), based on the presence of fewer and more lightly stained structures. Nevertheless, additional information can be gathered: the second metapterygial segment is forming at a more median location than what was observed in stage-32 specimen ANSP 174688. Proximal radials located in the anterior part of the fin are more darkly stained. Second-row proximal radials are chondrifying, but are still not fully differentiated from the mesenchymatous rods. In the larger specimens (ANSP 174682, 174691), the propterygium has transformed into a thick squarish-structure with two protruding squared-processes (Figures 2.1C, 2.2C). The articulation of the coracoid with the metapterygium has narrowed (Figure 2.2C).

The metapterygium still has a more lightly-stained area in its center. The second metapterygial segment has lengthened and shows clearly defined edges, and is located closer to the distal edge of the metapterygium. The middle radials have become well-defined rectangular structures, more darkly stained. Radials 20-21 of the first row are fused together. Second row proximal and distal radials have chondrified following an antero-posterior direction, and are present in the posterior part of the fins. In the largest specimen (ANSP 174691), a third row of proximal radials has formed (Figure 2.1C).

In stage-33 specimens, the condition of pelvic fins is similar to what is observed in the pectoral fins, namely that their development in the smallest specimen

(ANSP 174659) is less advanced than in a stage-32 specimen (ANSP 174688); lightly stained cartilaginous rods span nearly the entire length of the pelvic fins within the smallest specimen. In the larger specimens (ANSP 174682, 174691), the metapterygial complex loosely articulates with the pelvic girdle (Figure 2.1F). The distal edge of the metapterygial complex fuses with the first metapterygial segment, which still has a knob-like appearance. Nearly all middle radials are differentiated, with those at the posterior edge of the fin more lightly stained. The proximal extremities of middle radials 1-3 fuse together to form the basipterygial process. Proximal radials are chondrifying following an antero-posterior direction. Distal radials are chondrifying as lightly-stained elements with a diffuse outline.

In the longest specimen ANSP 174691, ridges are observed on the lateral side of the metapterygial complex, and these ridges articulate with the proximal and middle radials which are still part of the barely apparent mesenchymatous rods. The anterior clasper cartilage has become rounded, while the posterior clasper cartilage appears to be forming as two juxtaposed structures.

The pectoral fins of the smallest and largest stage-34 specimens (ANSP 174711, 174712) are not properly stained. In specimen ANSP 174692, the protruding squared-processes of the propterygium are thicker and articulate postero-medially with the coracoid. The median edge of the propterygium and the proximal edge of the metapterygial complex now tightly articulate together. The distal edge of the propterygium is slightly concave in order to articulate with the convex edge of the anterior radial element. The metapterygial complex and the second metapterygial segment are wider throughout their length and articulate together. The posterior edge of the second metapterygial segment is concave and articulates with the proximal extremity of the fused first row of proximal radials in the posterior section of the fin. Middle radials and the first, second and third rows of proximal radials are darkly stained. A fourth row of proximal radials is present within the

posterior section of the fin. Distal radials are chondrifying following an antero-posterior direction.

The pelvic fins of stage-34 specimen ANSP 174711 are less advanced than stage-33 specimen ANSP 174691, and those of specimen ANSP 174712 are not well-stained. In specimen ANSP 174692, the metapterygial complex is almost completely fused to the knob-like first metapterygial segment, creating the basipterygial complex (Figure 2.1G). A fenestrae remains between these elements, similar to the condition observed within the pectoral fin. Middle radials located anteriorly have the same width throughout their length and are thicker and shorter than middle radials located posteriorly, which have narrow proximal extremities. All proximal radials are present and darkly-stained, except for proximal radial 17 which is chondrifying. Distal radials are chondrifying following an antero-posterior direction, and are differently shaped depending on their position in the fin: distal radial 1 has an elongated shape, radials 3-9 are rectangular-shaped, while radials 10-16 are slightly rounded. The anterior clasper cartilage is taking a more elongated shape, and is closer to the basipterygial knob. The posterior clasper cartilage is becoming longer distally.

The development of paired fins is almost completed in stage 35; all pectoral elements are present by the end of this stage (Figure 2.2D). In the pectoral fins, the coracoid now principally articulates with the propterygium, although the medio-anterior apex of the metapterygial complex appears to still be associated with the coracoid (Figure 2.2D). The small fenestra remains in the posterior region of the metapterygial complex, whose posterior edge has widened. The proximal edge of the second metapterygial segment articulates more tightly with the distal edge of the metapterygial complex. The distal edge of the second metapterygial segment articulates distally with a small rounded element, interpreted as a third metapterygial segment. This third metapterygial segment

itself articulates distally with another element, triangular-shaped and pointing medially, which is interpreted as a fourth metapterygial segment. There can be up to four metapterygial segments present after the metapterygial complex, documenting intraspecific variation among specimens of the same stage. The lateral edges of the second metapterygial segment articulate distally with the surrounding proximal radials.

A total of 27 middle radials is present, with radials 3-24 being elongated rectangular structures with rounded proximal extremities and squared distal extremities, whereas radials 25-27 are more irregularly shaped. Middle radials have elongated proximo-distally along with the first, second and third rows of proximal radials. Second row and third row proximal radials may appear longer because of fusion between the second, third and fourth row radials. All distal radials are present, and radials 3-24 are wider. The shape of these radials varies according to their position; radials 1-3 are small, triangular-shaped, radials 5-12 are more hexagonal-shaped, and radials 13-27 are elongated. Small irregular-shaped elements, with no apparent regular segmentation, have appeared at the medio-distal edge of the fin (Figure 2.1D). In the smallest specimen (ANSP 174663), small cartilaginous elements, interpreted as interdistals, are present between distal radials 24-26 (Figure 2.1D). Four of the first row proximal radials, articulating with the second metapterygial segment, have fused together; their identity vary from first row proximal radial 18 to 23. In larger specimens, the interdistals are now present up to distal radials 12-13, and have become more triangular in shape. The irregular elements are also more numerous.

In the pelvic fins of stage-35 specimens, the basipterygium is complete, formed by the fusion of the metapterygium, the metapterygial process and the first metapterygial segment. The ridges associated with the articulating radials are more distinct, and the fenestra are smaller. The region of the basipterygium

articulating with the pelvic girdle has taken the appearance of a rounded ridge. Middle radials have elongated and their distal extremities are rounded. The first two middle radials (1-2) are longitudinally fusing together proximo-distally, and the proximal extremities of middle radials 1-4 fuse to the basipterygium to form the basipterygial process. Proximal radials are rectangular-shaped. Distal radials are more lightly-stained in the posterior part of the fin, and radials 1-2 fuse together. Similar to what is observed in the pectoral fins, distal radials are rectangular-shaped in the anterior section of the fin, rounded toward the middle and become triangular-shaped in the posterior section.

The anterior clasper cartilage is rounded proximally and wider distally, and articulates with the posterior clasper cartilage, which is thin, elongated, and slightly curved. In specimen ANSP 174687, the basipterygial process is complete and fused to the anterior region of the basipterygium articulating with the girdle. Proximal radials 18-20 have fused together and articulate with the concave posterior section of the basipterygium. All distal radials have chondrified, following an antero-posterior direction. In the longest specimen (ANSP 174653), the basipterygial process is narrower. The anterior extremity of the posterior clasper cartilage is wider and thinner. A female specimen (ANSP 174674) shows only one cartilaginous element present, its position corresponding to the anterior clasper cartilage. The proximal edge is rounded, whereas its distal edge is pointed.

The pectoral fins of stage-36 specimen form tightly articulated and compact structures, resulting from the appeared increase in size of the fin elements (Figure 2.1D). The median edge of the propterygium and the proximal edge of the metapterygial complex are longer; the small fenestrae remains distally within the metapterygial complex. More proximal radials have fused together including three second row proximal radials (19-21) articulating with fused first row proximal

radials 19-23. There is a fifth row of proximal radials present within the posterior region of the fin. Irregular elements are larger and fill the space between middle radial 27 and the last metapterygial segment, which is longer, thinner and points medially (Figure 2.1D). An interdistal element appears to be separating from distal radial 19 (Figure 2.1D).

Pelvic fins show a condition similar to that of the pectoral fins, where all elements appear more tightly associated (Figure. 2.1H). The middle and proximal radials are thinner and longer. Two small rounded structures, similar to irregular elements, are present posterior to the last distal radial (Figure 2.1H). The proximal edge of the anterior clasper cartilage is more rounded and forms a clear articulation with the concave posterior edge of the basipterygial knob. The posterior clasper cartilage has increased in thickness, and its anterior extremity forms a well-defined articulation with the posterior extremity of the anterior clasper cartilage.

Morphological similarities

The morphology of the pelvic fins is highly similar to that of pectoral fins (Figures 2.1D, H; 2.3). Both the pectoral and pelvic fins possess a metapterygial complex; a propterygium is lacking within pelvic fins. The pectoral fin has four or five metapterygial segments distal to the metapterygium. The third segment is rounded, the following one squared (when present) and the last one shaped as an elongated triangle, pointing medially. These segments are highly similar to the morphology of the metapterygial segments present in the pelvic fin, including the anterior and posterior clasper cartilages. The anterior clasper cartilage is rounded proximally and squared distally, whereas the posterior clasper cartilage is elongated and pointed distally. The pectoral fin includes an anterior radial element made of the fused anterior proximal and middle radials whereas the pelvic fin

includes a basipterygial process made of fused anterior middle radials. Both pectoral and pelvic fins have all three types of radials: proximal, median and distal. The pectoral fin has one to five rows of proximal radials, whereas the pelvic fin has only one row. Both pectoral and pelvic fins have one row of middle radials and one row of distal radials.

However, slight differences between pectoral and pelvic fins were also observed. Pectoral fins are elongated and exhibit greater morphological complexity compared to the rounded pelvic fins. There is an overall greater number of radials and more rows of proximal radials within the pectoral fins compared to the pelvic fins. Interdistal and irregular elements, which appear towards the end of fin development (stage 35), are present in the pectoral fin but not in the pelvic fin. The irregular elements are small cartilaginous structures that are present at the edge of the fin, between the last middle radials and the second and third metapterygial segments. These do not appear to be radials, since radials form earlier, chondrifying from the mesenchymal rods. Interdistals are also elements present only in the pectoral fin, although they were also reported in the pelvic fin by Didier (1995) and could be present in specimens larger than those used in the present study. These interdistals appear to be formed by the segmentation of the anterior portion of the distal radials. The progression of the pectoral fins chondrification precedes the progression of the pelvic fins.

Order and direction of development

The order in which the cartilaginous elements form in the pelvic fins is similar to that observed in the pectoral fins (Figure 2.3). The basal elements chondrify first, followed by the middle and proximal radials whereas distal radials were the last to chondrify. The metapterygial segments and the clasper cartilages chondrify later in development, when the majority of radials are formed. Irregular and interdistal

elements appear at the very end of pectoral fin formation.

The direction of formation of the mesenchymatous rods within the paired fins was not observed. The direction of formation of elements within the pelvic fins is similar to the one observed in pectoral fins (Figures 2.1, 2.3). The metapterygial complex of the paired fins chondrifies following a proximo-distal direction of formation. Metapterygial segments, including the claspers, chondrify following a proximo-distal direction. Radials (proximal, middle and distal) present in the anterior section of the fins are first to chondrify, followed by those in the middle and finally those in the posterior sections, thus also following an antero-posterior direction of formation. The formation of the anterior radial element and basipterygial process from the fusion of individual radials also follows an antero-posterior direction. The interradial elements of the pectoral fins appear to be the only ones following a postero-anterior direction of formation.

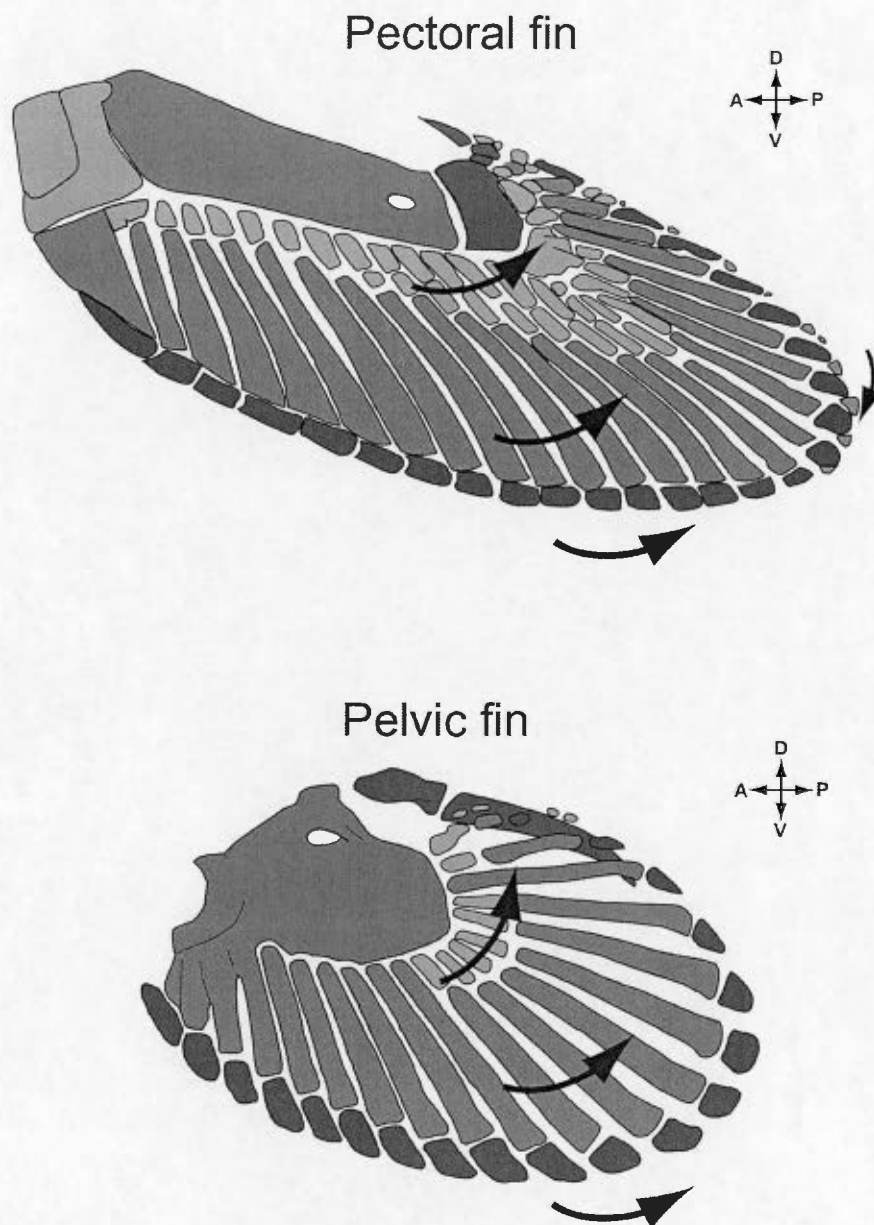


Figure 2.3. Diagram illustrating concordant elements of pectoral and pelvic fins of *C. milii* specimen ANSP 174675, stage 36. Similar elements are color-coordinated between paired fins. Arrows illustrate the direction of chondrification of basal and radial elements.

2.4 Discussion

Chondrichthyans are considered ideal basal gnathostomes in which to investigate paired fin development (Dahn *et al.*, 2007 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Gillis et Shubin, 2009 ; Tanaka *et al.*, 2002) because 1) they are gnathostomes of ancient lineage with still living representatives (Grogan et Lund, 2004 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003) and 2) they are purported to exhibit the most primitive fin morphology within extant vertebrates (Tamura *et al.*, 2001). An ontogenetic growth series of the chimaerid fish *C. milii* provided the opportunity to describe the ontogenetic progress of paired fin endoskeletal patterning. The morphological data collected within this study demonstrated that in *C. milii* paired fin morphology and patterning are highly similar, and that pectoral fins develop slightly in advanced compared to pelvic fins.

Morphological and patterning similarity in paired fins: serial homologues and modules

The anatomical similarity between the pectoral and pelvic fins of fossil and extant chondrichthyans has been mentioned by Rosen *et al.* (1981) and more specifically for extant species of chimaeras by Didier (1995, 2004) . Our results corroborate these observations. The highly similar morphology and concerted directions of endoskeletal patterning observed within *C. milii* paired fins suggest that paired fins are serial homologues (Horton *et al.*, 2008), similar to paired limbs (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). They are recognizable as homologues because they are variations of the same structural organisation and share at least part of a developmental circuit (Cracraft, 2005 ; Hall, 1995b) However, the serially homologous paired limbs are also considered morphological and developmental modules, among others (Raff, 1996 ; Winther, 2001 ; Young et

Hallgrímsson, 2005). This is because serial homologues result from the duplication of the underlying developmental program of a modular structure at a novel location and time (Beldade et Brakefield, 2003 ; Kuratani, 2009 ; Raff, 1996 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Modules are units that comprise numerous interacting parts that are functionally integrated (Goswami, 2007 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Poe, 2004 ; Raff, 1996), hierarchically organized and capable of independent evolutionary trajectory (Bolker, 2000 ; Klingenberg, 2002 ; Mitteroecker et Bookstein, 2007 ; Raff, 1996 ; Von Dassow et Munro, 1999 ; Wagner, 1996 ; West-Eberhard, 2003). A morphological module is composed of hierarchically organized parts (e.g., bones) within an organism and is investigated through anatomical studies (Winther, 2001). A developmental module is described in terms of the recurrent anatomical direction of formation (chondrification, mineralization) of serial elements such as radials and vertebrae inside morphological units (Cloutier, 2010 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Ward et Brainerd, 2007). Thus, the high degree of morphological and developmental similarity suggests that the pectoral and pelvic fins in *C. milii* constitute morphological and developmental modules. The concerted molecular developmental patterns observed within the paired fins of different species of chondrichthyans (Cole et Currie, 2007 ; Dahn *et al.*, 2007 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Sakamoto *et al.*, 2009 ; Yonei-Tamura *et al.*, 2008) further corroborates the presence of modules in paired fins. Although several modules have already been observed within the median fins of actinopterygians (Mabee *et al.*, 2002) and the vertebral column of fishes (Ward et Brainerd, 2007), none had been previously ascertained for the paired fins. The paired fin module described in *C. milii* is the first to be characterized in chondrichthyans, and in fishes in general.

Pelvic fins: a case of duplication?

The concerted morphology and endoskeletal patterning observed in the paired fins of *C. milii* suggest the presence of modules. Several evolutionary processes can affect modules such as dissociation, duplication and co-option (Raff, 1996). Because modules are physical units that can be rearranged spatially (Breuker, Debat et Klingenberg, 2006), a duplicated module can be deployed to another position within an organism (Rutishauser et Moline, 2005 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). Our data support the hypothesis of pectoral fin developmental mechanisms being duplicated at a posterior location which resulted into the origin of pelvic fins. The fact that pectoral fins develop before the pelvic fins, the relatively simplified anatomy of pelvic fins compared to pectoral fins along with the rudimentary development in females of what develops into the clasper elements in males also support this hypothesis. Reiteration of duplicated modules has also been suggested to account for the two dorsal fins present in extinct and extant chondrichthyans (Maisey, 2009) and in extant osteichthyans (Johanson *et al.*, 2009 ; Mabee *et al.*, 2002); the same process could account for paired fins.

Previous interpretations suggested that chondrichthyan paired fins were fundamentally different from one another, and that a high degree of similarity within their structural plan was either absent (Coates et Cohn, 1998) or a secondary condition (Zangerl, 1981). However, a high degree of similarity was observed in the morphology and development of the paired fins of *C. milii*, contradicting these statements. Pectoral and pelvic fins of basal gnathostomes were also proposed to develop differently during early ontogeny (Janvier, 2007) and similarity between them was hypothesized to be only found in sarcopterygians, tetrapods included (Coates, 2003).

Differences in the morphology and patterning of paired fins may be explained by the fact that changes between serial homologues can occur due to developmental and environmental factors (Hall, 1995b ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Young et Hallgrímsson, 2005) and modules can undergo transformation through time and experience evolutionary change (Bolker, 2000 ; Raff, 1996 ; Redies et Puellas, 2001 ; Schlichting et Pigliucci, 1998 ; Wagner, 1996).

This transformation of modules through time has been a major factor in fin and limb evolution (Mabee *et al.*, 2002 ; Shubin et Davis, 2004). The anatomical and developmental similarities between paired fins is proposed to result of an originally similar Bauplan obtained by the duplication of the original *Tbx4 / 5* gene ; this duplication of T-box gene would not be surprising since these genes are believed to have diversified from duplication and subsequent dispersion, and share redundant functions (King *et al.* 2006). Although forelimb identity (skeletal elements and muscles) appears to be the result of a generic limb program under *Tbx5*, hindlimb identity is conferred by, among other things, an unique repressor activity in *Tbx4* which, along with *Pitx1* activity, give hindlimbs their identity (Horton *et al.*, 2008 ; Ouimette *et al.*, 2010 ; Szeto *et al.*, 1999).

Although not verified in chondrichthyans, a similar situation may explain the anatomical and developmental similarities and differences observed within the paired fins of *C. milii*: the similar generic Bauplan represents the module, which is subsequently modified at the pectoral level resulting in a greater number of elements, or at the pelvic level resulting in a reduced number of elements. Gene activity (*Tbx4*, *Pitx1*) in the pelvic fins resulted, among other things, in the presence of claspers. Variations in the appearance and number of fin elements observed in zebrafish and chondrichthyans were correlated with different Sonic hedgehog (*Shh*) and retinoic acid (RA) expressions, and were thus suggested as possible factors further influencing paired fin morphology during the course of

their evolution (Dahn *et al.*, 2007 ; Sakamoto *et al.*, 2009).

Developmental trends: comparisons among gnathostome groups

Complete accounts of anatomical fin development within chondrichthyans are scarce, since few ontogenetic studies are available (Didier, 1995). Therefore, chondrichthyan fin development has led to much speculation, making it difficult to establish which developmental patterns are common to gnathostomes (Mabee *et al.*, 2002).

In order to understand how widespread the ontogenetic anatomical sequences observed within the paired fins of *C. milii* are, this ontogenetic data was compared to the one observed in other chondrichthyan species. There seems to be several developmental aspects that are similar, such that the mesenchymatous plate of both the pectoral and pelvic fins is divided before the onset of chondrification and that basal elements chondrify first, followed by radials as observed in *S. canicula* (Balfour, 1881 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Goodrich, 1906), *Pristiurus* (Cohn *et al.*, 2002b) and *Spinax* (*Etmopterus*) (Holmgren, 1933). The early formation of pectoral fins compared to pelvic fins was also observed in *S. canicula* (Ballard, Mellinger et Lechenault, 1993), *Leucoraja ocellata* (Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008), *L. erinacea* (Luer *et al.*, 2007) and this was previously observed by Didier *et al.* (1994) in *C. milii*. On the other hand, the hypothesis that the propterygium and mesopterygium resulted from the fusion of radials (Janvier, 1996 ; Rosen *et al.*, 1981), was not validated in *C. milii* because these basal elements chondrified as single elements and not as the fusion of radials.

Comparison with osteichthyan ontogenetic sequences is complicated by the different fin architecture and developmental processes observed in actinopterygians and sarcopterygians. Basal and derived actinopterygians retain

the propterygium and mesopterygium whereas the metapterygium is retained in the basal and lost in derived actinopterygians (Coates, 1994 ; Coates et Cohn, 1998). Basal and derived actinopterygians have pectoral fins that go through an initial endoskeletal disc stage (mesenchyme, cartilage), which subsequently subdivides into proximal radials. The metapterygium originates from an extension of the scapulocoracoid in basal actinopterygians (Davis, Shubin et Force, 2004 ; Mabee et Noordsy, 2004), and distal radials arise as *de novo* cartilaginous condensations in both basal and derived actinopterygians (Davis, Shubin et Force, 2004 ; Grandel et Schulte-Merker, 1998) .

Actinopterygian pelvic fins do not go through a disc phase, and elements chondrify individually (Akimenko *et al.*, 1995 ; Grandel et Schulte-Merker, 1998 ; Mercader, 2007). No clear developmental pattern was observed within the pectoral fins of basal-ward extant actinopterygians (Davis, Shubin et Force, 2004 ; Mabee et Noordsy, 2004). Grandel and Schultze-Merker (1998) concluded, upon reviewing several works, that formation of a pectoral disc of mesenchyme (*Acipenser ruthenus*, *A. stellatus*), procartilage (*Acipenser sturio*, *Amia calva*), or cartilage (*Polypterus senegalus*, *Lepidosteus* sp. and teleosts) is the common pattern of development among actinopterygians. Therefore, the chondrification of individual elements in the pelvic fins, the early development of the pectoral fins compared to the pelvic fins and the antero-posterior direction of patterning for the distal radials of pectoral fins are trends observed in both actinopterygians and chondrichthyans.

In contrast to the condition observed in teleost paired fins, sarcopterygians have retained the metapterygium but not the propterygium and mesopterygium (Rosen *et al.*, 1981 ; Zhu et Yu, 2009). Pectoral fins of the lungfish *Neoceratodus forsteri* start developing several weeks before pelvic fins, and the morphology and patterning is similar between fins (Joss et Longhurst, 2001). There is no

endoskeletal cartilaginous disc; individual mesenchymatous endoskeletal elements are transformed into cartilage following a proximo-distal direction of development (Joss et Longhurst, 2001). This is also observed within the paired limbs of derived sarcopterygians (tetrapods) (Weatherbee et Niswander, 2007 ; Young et Hallgrímsson, 2005). The development of pectoral fins in advance of pelvic fins and a proximo-distal direction of patterning is also observed within chondrichthyans. Trends that are common between chondrichthyans and osteichthyans are the formation of the pectoral fins before the pelvic fins, a proximo-distal direction of chondrification and morphological and patterning similarity between fins.

Determination of plesiomorphic conditions in paired fins

The trends reviewed above must be interpreted in a phylogenetic framework in order to determine if they reflect a plesiomorphic condition for gnathostomes. This framework should be as stable as possible in order to recover evolutionary patterns; however, relationships among fossil and extant gnathostomes are still only partly resolved (Brazeau, 2009 ; Brazeau et Friedman, 2015 ; Coates, 2003 ; Donoghue et Sansom, 2002 ; Goujet, 2001 ; Pradel *et al.*, 2013 ; Venkatesh, Erdmann et Brenner, 2001 ; Zhu et Yu, 2009). Furthermore, within gnathostomes, chondrichthyan relationships also remain poorly resolved (Grogan et Lund, 2009 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Pradel *et al.*, 2011 ; Stahl et Chatterjee, 2003). The Iniopterygii, in particular, are problematic, since they are considered either as stem chondrichthyans (Grogan et Lund, 2009) or as stem holocephalans (Pradel *et al.*, 2009 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Stahl, 1999 ; Zangerl, 1981). These unresolved relationships make the identification of plesiomorphic conditions difficult for this group.

A general phylogenetic framework was reconstructed based on Trinajstić *et al.* (2014), Pradel *et al.* (2010), Grogan and Lund (2009) and Zhu and Yu (2009) (Figure 2.4). The generalized developmental trends that were common to osteichthyans and chondrichthyans were mapped upon this framework and suggested as plesiomorphic conditions. The formation of pectoral fins before pelvic fins was considered plesiomorphic by Bininda-Emonds *et al.* (2007) and may represent a plesiomorphy for gnathostomes. The presence of paired appendage modules is also considered a plesiomorphic condition for gnathostomes since these are observed in sarcopterygians and *C. milii*.

The phenomenon of pectoral fin development before pelvic fins and the presence of a paired appendage module represent plesiomorphic developmental conditions for gnathostome paired fins; however, establishing the plesiomorphic morphological condition of paired fins is another matter. This task is hindered by gaps in the fossil record (Brazeau, 2009 ; Coates, 2003 ; Raff, 2007 ; Stahl et Chatterjee, 2003 ; Zhu *et al.*, 2009), resulting in a limited inventory of paired fin morphologies. This is complicated by the absence of pelvic fin information, resulting in studies focusing mostly on pectoral fins (Coates, 2003 ; Don, Currie et Cole, 2013 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Wagner et Larsson, 2007 ; Zangerl, 1981 ; Zhu et Yu, 2009). It is thus still debated whether the development and evolutionary trajectory of pelvic fins is similar to that of the pectoral fins (Rosen *et al.*, 1981; Shubin *et al.*, 1997; Coates and Cohn, 1998; Grandel et Schulte-Merker, 1998; Janvier *et al.*, 2004). Therefore the following discussion concerns the condition of pectoral fins only; the pelvic fin condition in fossil chondrichthyans is addressed afterwards.

The pectoral fin condition has traditionally been referred to as having either one (monobasal) or several endoskeletal basal elements (polybasal, including tribasal). There has been some confusion as to the exact meaning of these terms, since some

authors use it to describe the number of basal fin elements articulating with the girdle (Coates, 2003 ; Rosen *et al.*, 1981 ; Zhu et Yu, 2009) whereas others use the same term to designate the total number of basal elements present in the fin, whether these elements articulate with the girdle or not (Davis, Shubin et Force, 2004 ; Didier, 1995 ; Wagner et Larsson, 2007). In this study, the former meaning is used.

It has been suggested that a monobasal condition (Goujet, 2001 ; Janvier, Arsenault et Desbiens, 2004 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Rosen *et al.*, 1981 ; Zhu et Yu, 2009) or one composed a series of basal elements (Lund et Grogan, 1997) represent the plesiomorphic pectoral fin condition for gnathostomes. The pectoral fin condition for osteostracans, which are considered as the sister-group of gnathostomes, is considered to be a single disc of cartilage present in adult specimens, thus making it monobasal (Janvier, 1981 ; Janvier, Arsenault et Desbiens, 2004 ; Johanson, 2002). However, it is still unclear whether the pectoral fin condition of the osteostracan *Escuminaspis* is monobasal or polybasal (R. Cloutier, pers. com.). As for placoderms, both the monobasal (Goujet, 2001 ; Zhu et Yu, 2009) and tribasal (Goujet, 1984 ; Mabee, 2000 ; Wagner et Larsson, 2007 ; Young et Guorui, 1992) conditions have been proposed as plesiomorphic for the group. The only data available for acanthodians pertains to the Carboniferous species (*Acanthodes bronni*) which shows a tribasal condition (Coates, 1994, 2003 ; Zhu *et al.*, 2013). Basal actinopterygians have a tribasal condition (Goujet, 2001 ; Zhu et Yu, 2009) and although most sarcopterygians have monobasal condition (Coates, 2003 ; Janvier, 1996), basal-most sarcopterygians identified to date were shown to possess a polybasal pectoral fin (Zhu 2009). Thus, based on the condition observed from the fossil record, and the reconstructed phylogenetic framework used in this study, we suggest that basal condition for gnathostomes is monobasal.

The plesiomorphic pectoral fin condition in chondrichthyans has been hypothesized as monobasal (metapterygium only) (Goujet, 2001 ; Rosen *et al.*, 1981) or tribasal (propterygium, mesopterygium and metapterygium) (Coates, 2003 ; Compagno, 1977, 1999 ; Mabee, 2000 ; Wagner et Larsson, 2007 ; Zhu et Yu, 2009). Although the monobasal condition was observed in the oldest known articulated shark *Doliodus problematicus* (Miller, Cloutier et Turner, 2003), it was suggested as derived among chondrichthyans, since proximal premetapterygial and metapterygial radials (which can form a basal plate or not) are present in a majority of Paleozoic chondrichthyans (Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010). Zangerl (1981) and Lund and Grogan (1997) suggested that due to its prevalence, the condition in which unjointed radials are associated anteriorly with the girdle followed by small radial-supporting axial elements extending posteriorly represented the plesiomorphic condition for chondrichthyans. This condition could be interpreted as monobasal since the first of the axial element may represent the metapterygium.

The holocephalian (including the Iniopterygii) plesiomorphic condition of the pectoral fin has been proposed as monobasal with the presence of a single basipterygium (Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010), in which case the dibasal (propterygium and metapterygium) condition would be derived (Stahl, 1999 ; Coates et Sequeira, 2001). The purported dibasal condition reported in the Carboniferous *Traquairius spinosus* and *Debeerius ellefseni* has also been proposed as plesiomorphic by Coates (2003); however, the condition observed in *T. spinosus* could be considered monobasal (Lund et Grogan, 1997), and multibasal in *D. ellefseni* (Grogan et Lund, 2000). The Iniopterygii have a monobasal fin (Grogan et Lund, 2009 ; Pradel *et al.* 2010), but the lack of consensus on chondrichthyan relationships makes difficult the establishment of the plesiomorphic condition for the chondrichthyan pectoral fin . If the phylogenetic hypothesis proposed by Grogan and Lund (2009) is considered, the

plesiomorphic condition for chondrichthyans would be monobasal, whereas it would be a polybasal condition if Pradel *et al.*'s (2010) hypothesis is taken into account.

As for the pelvic fins, the presence of a metapterygial axis is considered a basal condition (Coates, 2003 ; Compagno, 1977 ; Grogan et Lund, 2004 ; Rosen *et al.*, 1981 ; Zangerl, 1981). Even though the pelvic fin structure of some fossil chondrichthyans is still not well understood, the Carboniferous fauna displayed enough information to enable Lund and Grogan (1997) to hypothesize the evolutionary history of the pelvic fin and clasper in male chondrichthyans. The plesiomorphic condition (after *Stethacanthus altonensis*) is hypothesized to be a series of radials articulating directly with the girdle, with a small metapterygial plate posterior to the girdle (Lund, 1985); this condition then shifted towards the development of an elongated basipterygium (and the alignment of the clasper with it) and the articulation of most radials upon this basipterygium (Lund et Grogan, 1997).

From the above review of purported plesiomorphic conditions within gnathostomes in general, and chondrichthyans in particular, fin conditions are usually characterized based upon the number of basal elements present in the adult phenotype of the pectoral fin. However, it is important to keep in mind that the adult condition of fossil and extant species may represent a modification (e.g. fusion of elements) from the embryonic condition; this was observed in *C. milii* in the case of the metapterygial complex (Figure 2.2) and anterior radial element and basipterygial process in *C. milii* (Didier, 1995 ; this study). The possibility of secondary fusion of radials and basals was also raised by Zangerl (1981), Compagno (1977; 1999), Didier (1995), Janvier (1996), Lund and Grogan (1997) and Pradel *et al.* (2010).

Furthermore, the difference between what constitutes a basal or an enlarged radial is difficult to define and is not yet resolved (Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010 ; Rosen *et al.*, 1981); the series of small radials articulating with the girdle may actually represent basals. The number of basals articulating with the pectoral girdle can also vary between early and late development; in *C. milii*, both the propterygium and metapterygium articulated with the coracoid in stages 31 and 32 (Figures 2.2A, 2.2B) whereas the configuration of the elements changed later in development, where only the propterygium articulates with the coracoid, and the metapterygium only articulates with the propterygium, which is also the condition observed in the adult. Therefore, ontogenetic data reveals information which is not present in the adult condition, and should be considered when inferring homology and plesiomorphic conditions. For example, if the early ontogenetic morphology of *C. milii* is taken into account, the pectoral fin would be considered tribasal, such as in elasmobranchs, rather than dibasal.

Figure 2.4 shows the plesiomorphic and derived fin conditions mapped on a phylogenetic framework. As for chondrichthyans, a simplified phylogeny is used, with iniopterygians placed either as stem chondrichthyans following Grogan and Lund (2009) or as stem holocephalans following Zangerl (1981), Stahl (1980, 1999) and Pradel *et al.* (2010). Although the use of the term “polybasal” (Zhu and Yu, 2009) leads to a decrease in precision, since the basals referred to may not be homologous structures among species, it is used here as the condition for holocephalans because of the early fin condition (propterygium and metapterygial complex articulating with the coracoid) observed in *C. milii* (Figure 2.2). The plesiomorphic condition of osteostracans and placoderms is hypothesized as monobasal whereas the plesiomorphic condition in crown gnathostomes is hypothesized as polybasal.

Other fin characteristics include the presence of an endoskeletal disc phase, which was suggested as the plesiomorphic pattern of development in gnathostomes (Grandel et Schulte-Merker, 1998). From the information observed in extant forms taken as proxy for basal gnathostomes such as *S. canicula* (Freitas, Zhang et Cohn, 2007) and *C. milii* (this study), this could be the case if the endoskeletal disc is composed of mesenchyme, not cartilage. The condition in which a mesenchymatous disc is first transformed into cartilage and then remodeled by cell apoptosis as observed in actinopterygian pectoral fins (Davis, Shubin et Force, 2004 ; Grandel et Schulte-Merker, 1998 ; Mabee et Noordsy, 2004) is a derived condition of crown gnathostomes.

It is interesting to note that in most basal actinopterygians, the disc appears to remain pre-cartilaginous during its subdivision into the different fin elements. Finally, the presence of a paired appendage module, a proximo-distal direction of patterning and the early development of pectoral over pelvic fins is plesiomorphic for extant gnathostomes.

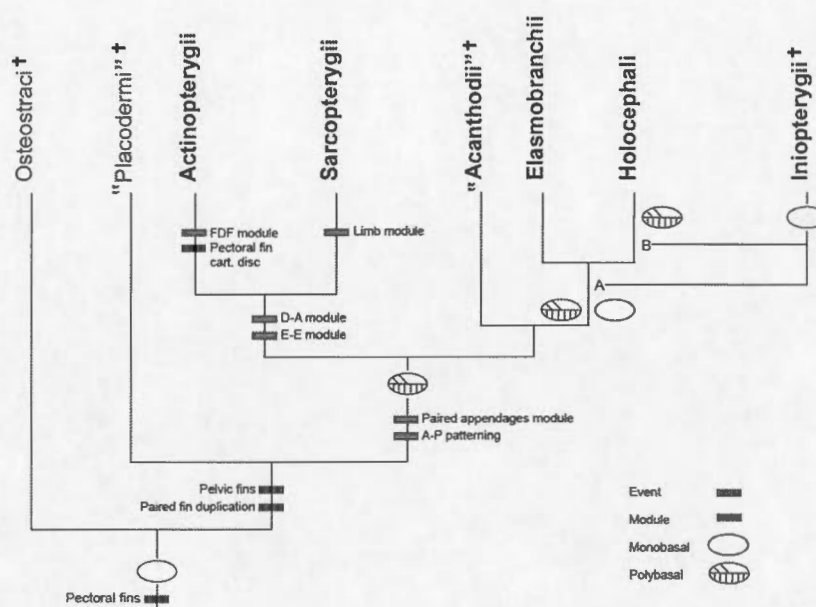


Figure 2.4. Vertebrate phylogeny showing paired fins condition, evolutionary events and modules. Relationships are illustrated using a general phylogenetic framework reconstructed based on Trinajstić *et al.* (2014), Pradel *et al.* (2010), Grogan and Lund (2009) and Zhu and Yu (2009). Two alternative hypotheses of chondrichthyan relationships are illustrated: A = Grogan and Lund (2009), B = Pradel *et al.* (2010). A-P patterning: antero-posterior appendage patterning; D-A module = dorsal + anal fin patterning module (Mabee *et al.*, 2002), E-E module = exoskeleton-endoskeleton module (Mabee *et al.*, 2002), FDF = first dorsal fin module (Mabee *et al.*, 2002); Pectoral fin cart. disc = pectoral fin cartilaginous disc. Crown gnathostomes are in bold, taxon marked with a cross are extinct and with “ ” are hypothesized as paraphyletic.

2.5 Conclusion

Knowledge of paired appendage morphological patterning, although quite extensive in derived sarcopterygians such as tetrapods, has remained elusive in basal extant gnathostomes such as chondrichthyans. The lack of information pertaining to endoskeletal morphogenesis for this group hindered the study of

evolutionary patterns and the determination of plesiomorphic conditions for extant gnathostomes. Morphological and developmental similarities within paired fins of the chimaerid fish *C. milii* are consistent with their status as serial homologues and suggest that these are morphological and developmental modules. This supports the hypothesis of a duplication of the original developmental program present in the pectoral fins into a posterior position, resulting in pelvic fins.

Furthermore, a monobasal pectoral fin is suggested as the plesiomorphic condition for gnathostomes, whereas a polybasal condition is plesiomorphic for extant crown gnathostomes, including chondrichthyans. Further research within extant and extinct basal gnathostomes is necessary to better understand the modification of paired fin morphology through time. Anatomical studies describing the endoskeletal patterning of paired fins of other chondrichthyan species is essential to comprehend the mechanisms at work. Furthermore, in order to complement this morphological information, the molecular mechanisms observed during the fin development of chimaerids must be investigated. This would provide a comprehensive view of paired fin development in chondrichthyans.

Acknowledgments

The authors are grateful to Richard Lund (Carnegie Museum of Natural History) for help and scientific input. We would also like to thank the staff at the Academy of Natural Sciences of Drexel University for the loan of specimens. Help from the students of the Grogan-Lund lab and Cloutier Lab was greatly appreciated. Funding from NSERC (RC) and Research Chair in Paleontology (RC).

CHAPITRE III

FORMATION OF THE OCCIPITAL REGION AND SYNARCUUM IN THE CHIMAERID *CALLORHINCHUS MILII*

Cyrena Riley¹, Eileen D. Grogan² and Richard Cloutier¹

Affiliation :

¹ Laboratoire de Biologie évolutive, Université du Québec à Rimouski, Rimouski,
Québec, G5L 3A1

² Department of Biology, St-Joseph's University, Philadelphia, Pennsylvania,
19131-1395

Contribution des co-auteurs (initiales)

Mise en place du protocole expérimental (CR, EDG, RC)

Récolte des données (CR)

Analyse des données (CR, EDG, RC)

Interprétation des résultats (CR, EDG, RC)

Rédaction du manuscrit (CR)

Corrections et commentaires du manuscrit (EDG, RC)

Financement (RC)

Résumé

De récentes études concernant la région occipitale du chondrôcrane et la région synarcuale des chondrichthyens ont soulevé plusieurs questions concernant l'homologie entre ces deux systèmes morphologiques. Les régions occipitale et synarcuale possèdent une morphologie très divergente au cours des derniers stades de développement. Cependant, elles sont toutes deux issues de sclérotomes homologues sériés, et elles pourraient donc être similaires au cours de leur développement précoce. La composition de la région occipitale a aussi été suggérée comme étant homologue parmi les chondrichthyens, bien que le nombre et l'identité des éléments vertébraux incorporés dans cette région n'aient pas été comparés. Finalement, les synarcua des raies et des chimères sont considérés non-homologues bien que leur ontogénie n'ait jamais été comparée. Une série ontogénétique d'embryons doublement colorés de *Callorhinchus milii* a été utilisée afin de décrire la progression de la chondrification dans les régions occipitale et synarcuale, afin de répondre à ces questions. Le développement des régions occipitale et synarcuale diffère. Aucun élément vertébral distinct n'a été observé dans la région occipitale du chondrocrâne. Un inventaire de la composition de la région occipitale des chondrichthyens révèle que l'identité des éléments vertébraux incorporés n'est pas homologue chez ce groupe, indiquant ainsi une plus grande disparité que suggérée par le passé. Finalement, la non-homologie entre les synarcua de raies et de chimères est supportée pour la première fois par des données ontogénétiques.

Mots-clefs :

Callorhinchus milii, région occipitale, synarcuum, élément vertébral, homologie, chondrichthyen

Abstract

Recent studies concerning the occipital and synarcual regions of chondrichthyans raised several questions about the homology between these morphological systems. The occipital and synarcual regions have highly divergent morphologies in late developmental stages; however, because they originate from serially homologous sclerotomes, they could show similarity early in their development. Also, the composition of the occipital region was suggested as homologous among chondrichthyans, although the vertebral elements incorporated in this region were not compared. Finally, the batoid and chimaera synarcua are considered non-homologous, but their ontogeny was never compared. Therefore, an ontogenetic series of cleared-and-double stained specimens of the chimaera *Callorhinchus milii* was used in order to describe the progression of chondrification in the occipital and in the synarcual regions. Early development of the occipital and synarcual regions differs. There are no distinct vertebral elements observed incorporated into the occipital region of the chondrocranium. A review of the composition of this region for chondrichthyans reveals that the identity of the incorporated vertebral elements is not homologous in this group, thus indicating a greater disparity than previously appreciated. Finally, the non-homology between the synarcua of batoids is supported for the first time using ontogenetic data.

Keywords: *Callorhinchus milii*, occipital region, synarcuum, vertebral element, homology, chondrichthyan

3.1 Introduction

The presence of vertebral elements associated with a notochord is a characteristic of gnathostomes (Arratia, Schultze et Casciotta, 2001). The vertebral column is an antero-posterior organized anatomical system that evolved into a regionalized structure (Morin-Kensicki, Melancon et Eisen, 2002). This regionalization can be defined as a similarity in the morphology (size, shape and composition) of the vertebrae within specific regions along the notochordal axis. The amount of regionalization observed within the notochordal axis varies across vertebrates (Gomez et Pourquié, 2009 ; Ward et Brainerd, 2007). In extant fishes, regionalization can be observed within the cranium and the vertebral column (Bird et Mabee, 2003 ; Nowroozi *et al.*, 2012). Within the cranium, the occipital region is the posterior region of the chondrocranium where vertebral elements have been incorporated (Bemis et Forey, 2001 ; Britz et Johnson, 2010 ; Ward et Brainerd, 2007). The number and kind of elements (i.e., neural arches, basidorsals, basiventrals) incorporated vary among taxa (Bemis et Forey, 2001). The vertebral column of extant fish is usually separated into the trunk and the caudal regions based on the morphology of their vertebrae (Nowroozi *et al.*, 2012 ; Schilling, 2011).

Little research has focused on the description of the occipital region of the cranium in gnathostomes. In answer to this paucity of data, Bemis and Forey (2001) provided an overview of the number of occipital arches incorporated into the cranium of various groups of fishes, more specifically in actinopterygians; they found a great disparity in the number of vertebral elements incorporated within this region. Britz and Johnson (2010) also surveyed the composition of the occipital region of actinopterygians; they argued that the occipital region of all actinopterygians they investigated was homologous, and included three segments indicated by the number of attached myosepta. They argued that differences from

this condition are due to the fusion, during ontogeny, of the vertebral elements of additional segments. As for chondrichthyans (i.e., sharks, batoids and chimaeras), the number of vertebral elements incorporated into the cranium was evaluated by surveying two species, *Squalus acanthias* and *Etmopterus* sp. (Bemis et Forey, 2001). However, the condition observed in these two species may not reflect the condition present in other chondrichthyans, notably the Holocephali, which have evolved separately from elasmobranch fishes most likely since the Carboniferous period, some 330 mya (Grogan et Lund, 2004). Britz and Johnson (2010) suggested that the occiput of all chondrichthyans was probably homologous and contained the same number of vertebral segments, and recommended that further investigation should be made.

The synarcuum is a postcranial compound structure resulting from the fusion of the anterior vertebral elements (Claeson, 2011 ; Grogan et Lund, 2000 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Stahl, 1967, 1999). Although synarcua are present in extinct placoderms and in extinct and extant chondrichthyans (batoids and Holocephali), these compound structures are not considered homologous among these different groups (Johanson *et al.*, 2013 ; Maisey, 1986 ; Patterson, 1965). Among chondrichthyans several extant shark species, although not exhibiting synarcua, show modified vertebral morphologies in the anterior part of the vertebral column, in the region between the posterior boundary of the occipital region and the level of the pectoral fins (Claeson et Hilger, 2011), whereas batoids (skates and rays) and chimaeras possess a synarcua (Claeson, 2011) (Figure 1). However, embryological studies of synarcuum formation are scarce for both groups (Claeson, 2011 ; Miyake, 1988). Chondrification and mineralization of the synarcuum of *Raja asterias* was investigated by Claeson (2011) and the formation of a chimaera synarcuum was described by Johanson *et al.* (2010) based on one specimen of *Chimaera monstrosa*. Recently, Johanson *et al.* (2015) showed that the synarcuum of *Callorhynchus milii* embryos formed from a secondary fusion of

separate vertebral elements and not from a lack of segmentation of the anterior region of the vertebral column. Johanson *et al.* (2015) did not, however, describe the complete sequence of chondrification of the synarcuum.

The vertebral column and the occipital region of the cranium develop from consecutive post-otic sclerotomes and can thus be considered serial homologues (Johanson, Carr et Ritchie, 2010). Because homologous structures may appear far more similar during early ontogeny than in latter developmental stages (Scholtz, 2005 ; Moczek, 2008), it can be hypothesized that early embryological stages of serially homologous sclerotomes would be similar (Johanson *et al.*, 2010). However, morphological studies providing detailed information on skeletal development are scarce for extant taxa that are phylogenetically basal, even though they are crucial for providing a fundamental framework upon which molecular, functional and phylogenetic information can be compared. For example, understanding the function and diversity of vertebrate axial structures and how these have evolved through time is critical for ascertaining the impact of genetic control over it (Koob et Long, 2000).

In order to address this lack of information and to assess developmental changes, complete ontogenetic series are needed (Adriaens et Verraes, 2002), especially to determine patterns of fusion that occur between vertebral elements (Bemis et Forey, 2001). Among vertebrates, extant chondrichthyans represent ideal ontogenetic models, since they are phylogenetically the most basal living gnathostome group exhibiting both an occipital region and a synarcuum. Furthermore, within extant neochondrichthyans, relationships are still unresolved (Dunn et Morrissey, 1995 ; Naylor *et al.*, 2005) and thus because both batoids and chimaeras possess a synarcuum, studying its ontogeny could be critical for understanding chondrichthyan diversification (Claeson, 2011).

This is particularly important concerning the batoid and chimaera synarcua, since they are considered non-homologous structures. Although the ontogeny of specific anatomical systems has been described previously in chimaeras (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Didier, Stahl et Zangerl, 1994 ; Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Stahl, 1967), the formation of the occipital region and vertebral column has never been described using a complete ontogenetic series. Yet, information from ontogenetic sequences are necessary to validate the ontogenetic criteria used in determining homologies (Ereshefsky, 2010 ; Rieppel, 2005); indeed, from a developmental point of view, the critical feature of homology is their ontogenetic development (Amundson, 2001). This lack of embryological information concerning holocephalans thus impedes greater understanding of gnathostome evolution (Pradel *et al.*, 2013). The family Callorhynchidae is considered basal within extant chimaeras based on morphological and molecular data (Didier, 1995 ; Licht *et al.*, 2012), and the elephant shark *Callorhincus milii* has recently gained popularity as a model species for investigating evolutionary questions (Heinicke, Naylor et Hedges, 2009 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013). Therefore, a developmental serie of *C. milii* was used in order to investigate endoskeletal patterning in a holocephalan and answer the above questions.

Therefore, the first objective of this study was to provide a description of the morphology and chondrification of the occipital region and synarcuum of *C. milii* (Figure 3.1). This information was then used to verify whether the occipital and anterior vertebral column regions, which originate from serially homologous sclerotomes, exhibit similar morphology and developmental patterns. The second objective was to verify whether the number and identity of vertebral elements incorporated into the occipital region of chondrichthyans is homologous among taxa. Finally, the third objective is to use the ontogenetic information obtained

from the growth series of *C. milii* in order to validate the purported non-homology of the synarcua of batoids and chimaeras.

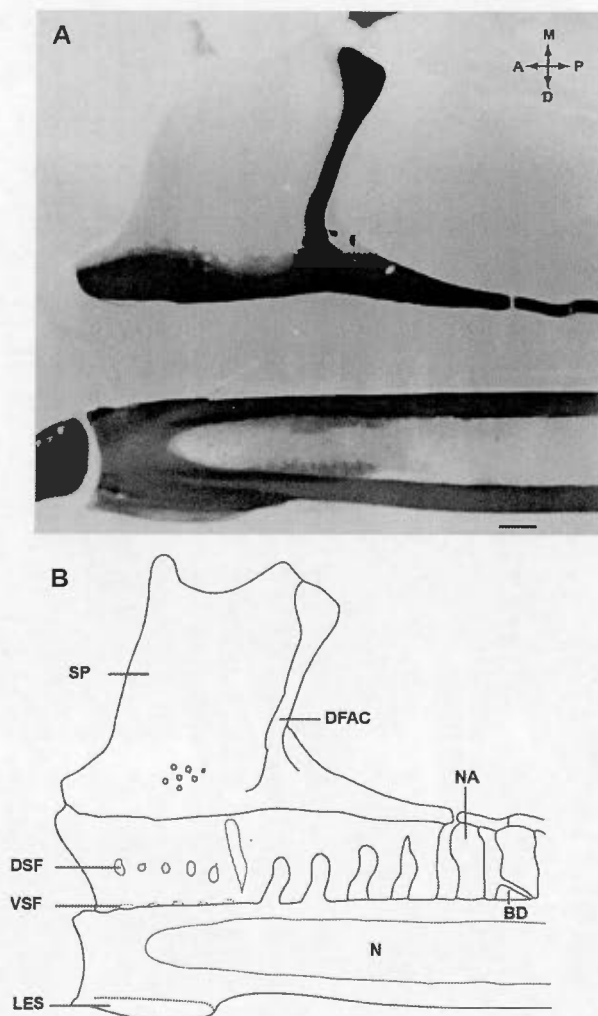


Figure 3.1. Synarcuum of *C. milii*. Drawing (B) made from picture (A) of newly hatch cleared-and-stained specimen ANSP 174713, left side; stippled lines are elements that are unclear due to the specimen being cut longitudinally. BD, basidorsal; DFAC, first dorsal fin attachment cartilage; DSF, dorsal synarcual spinal nerve foramen; LES, lateral extension of synarcuum; N, notochord; NA, neural hemiarch; SP, synarcuum plate; VSF, ventral synarcual spinal nerve foramen. Scale bar = 1mm.

3.2 Materiel and Methods

Twenty-three cleared and double-stained embryos (stages 29-36, Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998) and two hatched juveniles (Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998) of the chimaera *Callorhinchus milii*, housed in the collection of the Academy of Natural Science of Drexel University, Philadelphia (ANSP), Pennsylvania (USA) were used for this study (Table 3.1). The cleared and double-staining technique follows Hanken and Wassersug's (1981) protocole with modifications from Potthoff (1984) (Didier, 1995). Following this technique, cartilaginous elements are stained with Alcian blue, and mineralized elements with Alizarin red, thus enabling the visualization of skeletal patterning. Description of occipital and synarcuum development is provided by specimen stages. For incomplete specimens, information is reported either for the synarcuum or the occipital moieties. There was no mineralization observed on the endoskeletal elements of the occipital or synarcuum region. Specimens were observed and photographed using a digital camera mounted on a dissecting microscope (Olympus ZH10 research stereomicroscope and Olympus SZ50 dissecting microscope). These photographs were then optimized (brightness /contrast, exposure and invert tools) using tools from Adobe Photoshop (CS4) in order to display structures optimally. Drawings were made from the photographs. Terminology of spino-occipital nerves follows Schauinsland (1903). Terminology of cranial structures follows de Beer (1937) and Didier (1995). Structures that were not identified in previous studies are named herein.

Table 3.1. Stages, ANSP catalog number, total length (mm) and conditions of *C. milii* specimens.

Stage	ANSP catalog number	Total length (mm)	Condition of occipital and synarcual regions
29	174694	56.25	Tissue still present
29	174695	62.10	Tissue still present
29	174690	66.75	Tissue still present
30	174667	69	Well stained
30	174665	69.3	Well stained
30	174658	69.5	Well stained
30	174656	71.95	Well stained
31	174693	72.75	Tissue still present
31	174689	79.3	Well stained
31	174661	79.4	Well stained
32	174696	74.05	Well stained
32	174688	75.90	Poorly stained
33	174659	78.7	Poorly stained
33	174682	80.97	Poorly stained
33	174691	83.6	Well stained
34	174711	87	Poorly stained
34	174692	89	Poorly stained
34	174712	98	Well stained
35	174663	95	Poorly stained
35	174674	100	Poorly stained
35	174687	101.6	Poorly stained
35	174653	103.85	Poorly stained
36	174675	110	Poorly stained
Hatch	174714	166	Well stained, head only
Hatch	174713	205	Poorly stained

3.3 Results

In stage-29 specimens, the anterior part of the notochord is visible within the cranium; it curves towards the dorsum sellae and then bends ventrally, extending into the level of the orbits. The anterior-most part of the notochord then turns upward into the cranium, making an 80° angle with the orbital floor. The paired parachordals are the only structures present within the post-orbital region of the cranium; they are thin and diffuse cartilaginous bars that are positioned laterally on each side of the notochord. The anterior limit of the parachordals appears to end anteriorly to the curvature of the notochord into the orbital region, whereas the posterior limit does not reach the posterior boundary of the occipital region. There are no structures present in the synarcuum region, except for the notochord, which is wider than in the cranial region. There is a notochordal constriction marking the boundary between the posterior cranial region and the anterior region of the synarcuum.

In stage-30 specimens (Figure 3.2A), the parachordals are darkly-stained and their outline is better defined. The anterior part of the parachordals becomes progressively thicker and shows ventral projections elongating downward. The posterior part of the parachordals has become wider and rounded, and is progressing towards the boundary of the notochordal constriction. The anterior and posterior cartilages of the otic capsule are chondrified, dorsal to the notochord. There are no elements visible within the synarcual region.

The occipital and synarcual regions show important changes among the three stage-31 specimens, such as the appearance of new elements and the fusion of pre-existing ones. In the occipital region of the early stage-31 specimen (ANSP174693), no new elements appear to be present. Within the occipital region of the middle stage-31 specimen (ANSP174689), the posterior extremity of the

parachordals has nearly reached the posterior boundary of the occipital region, and has begun expanding ventro-dorsally toward the otic capsules. The anterior and posterior basicapsular commissures are formed, constricting the metotic fissure, and delineating the foramen of the glossopharyngeal nerve (IX) antero-ventrally to the otic capsule. The posterior basicapsular commissure delineates the anterior boundary of the future foramen for the vagus nerve (X). Ventro-posterior to the vagus nerve foramen are three foramina for the passage of three spinal nerves; these foramina are formed by the dorsal progression of cartilage from the parachordals, around the nerves, towards the otic capsules. These nerves are tentatively identified as occipital nerve b and c and ventral root of spinal nerve a. There are no vertebral elements observed within the occipital region. In the occipital region of the late stage-31 specimen (ANSP174661) (Figure 3.2B), the foramen of the glossopharyngeal nerve is clearly delineated, and the foramen of the vagus nerve is closed posteriorly by the anterior edge of the occipital arch.

In the synarcual region of the early stage-31 specimen (ANSP174693), there are no elements present on the notochord. In the middle stage-31 specimen (ANSP174689), several structures are associated with the notochord in the synarcual region. Basidorsals 1-12 are present dorsally on each side of the notochord, posterior to the notochordal constriction. Neural hemiarches 2-12 are present, fused with their respective basidorsals, except for hemiarches 12, that are forming distal to their associated basidorsals. The distal part of neural hemiarches 2-4 is fused together, outlining the ventral spinal nerve foramina 2-4. The dorsal part of fused neural hemiarches 2-3 expands distally. An elongate cartilage is present latero-ventral on each side of the notochord, starting just posterior to the occipital margin and ending at the level of basidorsals 7. This is the anterior ventral cartilage of the synarcuum (AVCS) and there are no defined basiventrals within this ventral cartilage, or posterior to it at this stage. The anterior extremity

of this cartilage is slightly wider than the posterior one, and is curved to articulate with the rounded posterior extremity of the parachordals.

Basidorsals and neural hemiarches are present immediately posterior to the synarcual region, but have not yet formed posterior to the second dorsal fin level. These basidorsals and neural hemiarches are comparatively smaller and more lightly stained, thus suggesting that they appear in an antero-posterior direction. In the late stage-31 specimen (ANSP174661) (Figure 3.2B), the dorsal part of fused hemiarches 2-3 and the basidorsals and neural arches are more darkly stained and defined. The AVCS is more clearly defined, its median edges reaching toward each other ventro-medially.

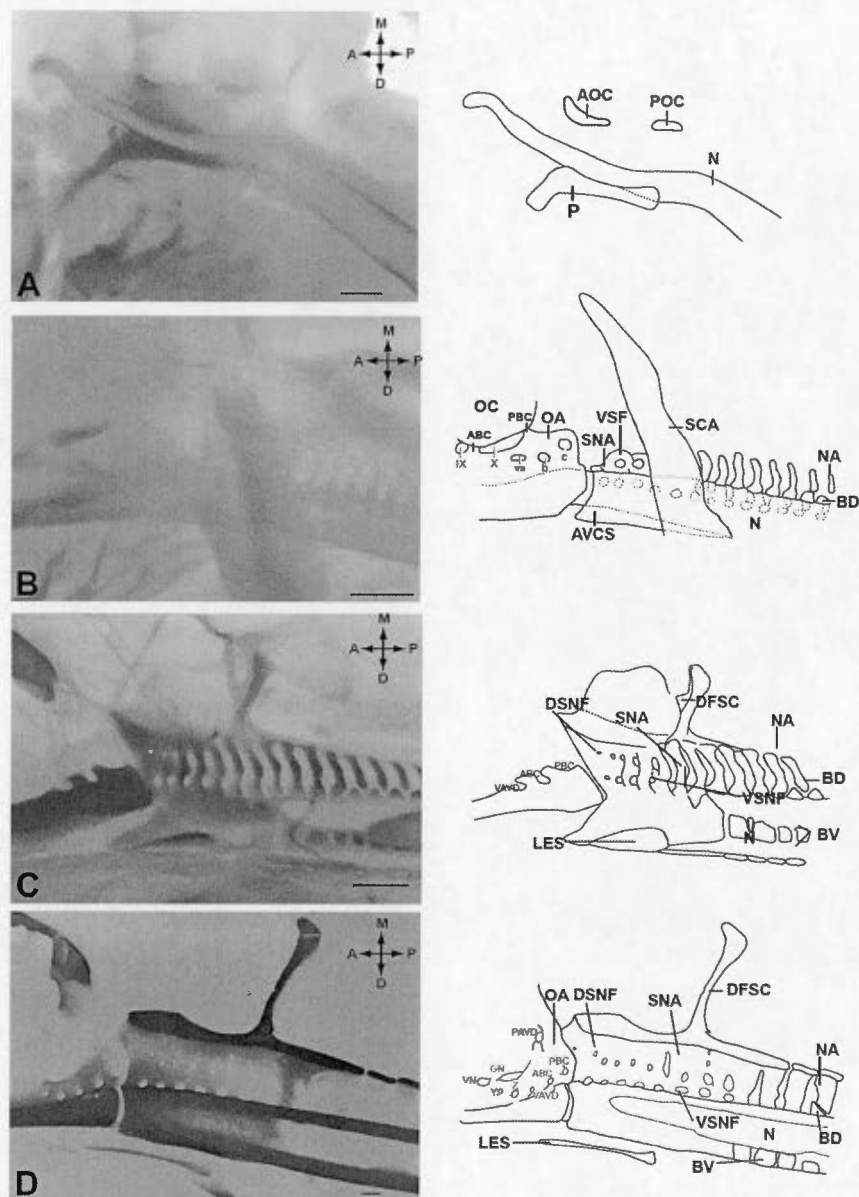


Figure 3.2. Occipital region and synarcium of embryonic and newly hatch specimens of ontogenetic series of *C. milii*. (continued on following page).

Figure 3.2. (Continued). Original photograph on left column; drawing from the photograph on the right; only relevant structures are illustrated. Occipital and spinal nerve abbreviations are in smaller font. All specimens are in lateral view. **A.** Stage 30 (ANSP 174667). **B.** Stage 31 (ANSP 174661). **C.** Stage 34 (ANSP 174712). **D.** Stage newly hatched, (ANSP 174713), right side without synarcuum plate; left side with synarcuum plate illustrated in Figure 3.1. ABC, anterior basicapsular commissure; AOC, anterior otic cartilage; AVCS, anterior ventral cartilage of synarcuum; b, foramen of spinal nerve b; BD, basidorsal; BV, basiventral; c, foramen of spinal nerve c; da, dorsal foramen of spinal nerve a; DFAC, first dorsal fin attachment cartilage; DSF, dorsal synarcual spinal neural foramen; IX, foramen of glossopharyngeal nerve; LES, lateral extension of synarcuum; N, notochord; NA, neural hemiarch; OA, occipital arch; OC, otic capsule; P, parachordal; PBC, posterior basicapsular commissure; POC, posterior otic cartilage; SCA, scapula; SNA, synarcuum neural hemiarch; SP, synarcuum plate; va, ventral foramen of nerve a; VSF, ventral synarcual foramen; X, foramina of vagal nerve; y, foramen of occipital nerve y; z, foramen of occipital nerve z. Scale bar = 1mm.

The two stage-32 specimens show marked differences in their state of development. In the occipital region of the early stage-32 specimen (ANSP174696), the base of the occipital arch is stained similarly to basidorsals 1-2 of the synarcual region; however, there is no clear outline of discrete basidorsals. In the occipital region of the late stage-32 specimen (ANSP 174688), the occipital arch appears to be fused to the otic capsule and the outline of the vagus nerve foramen is visible.

Within the synarcual region of the early stage-32 specimen (ANSP 174696), the neural hemiarches, now completely fused with their associated basidorsals, are thicker and slightly curved. The base of neural hemiarches 2-5 are joined by cartilaginous bridges, and these form the ventral edge of the ventral foramina. The ventral foramina 2-4 are now clearly delineated, and dorsal foramina 2-3 are beginning to form. The chondrification of the ACVS is progressing dorsally toward the basidorsals, surrounding the notochord, and laterally, with the formation of lateral extensions similar to the lateral stays observed on batoid

synarcua. The posterior limit of the ACVS reaches the level of basidorsals 8. Basiventrals appear to be forming ventral to the notochord, following the posterior limit of the synarcuum. In the late stage-32 specimen (ANSP 174688), neural hemiarches 2-10 are larger compared to posterior ones. The distal extremity of neural hemiarches 2-5 has greatly widened and slightly extended, and dorsal foramina 2-5 are present. The distal extremity of neural hemiarches 8-10 has widened, but less than what is observed in the anterior region of the synarcuum (neural hemiarches 2-5). The distal extremity of hemiarches 8-10 has also greatly extended, and fuses with its counterpart medially, dorsal to the notochord. The distal extremity of neural hemiarches 8 articulates with a distally projecting cartilaginous structure, the first dorsal fin attachment cartilages (DFAC). This structure is slightly curved backwards, and more lightly stained in the middle. The DFAC articulate on each side with the anterior basal edge of the first dorsal fin. Basiventrals 9-12 are present, basiventrals 9 abutting to the posterior limit of the ACVS.

In the occipital region of stage-33 specimens, the parachordals surround the notochord ventrally. A cartilaginous bridge has formed between the posterior part of the otic capsule and the distal part of the occipital arches, resulting in the formation of the dorsal foramina of the first spinal nerve a.

In the synarcual region of stage-33 specimens, the distal extremity of neural hemiarches 8-10 have extended and fused together, and with the ventral extremity of the DFAC. This forms the posterior region of the dorsal surface of the synarcuum, which decreases in height antero-posteriorly. The DFAC has widened distally, and its extremity, articulating with the first dorsal fin, is slightly curved. In the synarcual region, neural hemiarches 1 have formed. The enlarged distal extremity of neural hemiarches 1-6 has fused together, forming lateral rectangular cartilages. The synarcual plate is forming as an irregular cartilaginous mass dorsal

to the distal extremities of neural hemiarches 5-6 and anterior to neural hemiarches 8.

Within the occipital region of stage-34 specimens, the occipital region appears nearly completed. There are five ventral foramina (occipital nerve y, z and spinal nerve a, b, c) present, in addition to the foramina of the glossopharyngeal and the vagus nerves, and one dorsal foramen (dorsal root of nerve a). The foramen of occipital nerve y is located ventral to the anterior limit of the vagal nerve foramina. The occipital nerve z is located directly under the vagal nerve foramina, and the spinal nerves follow posteriorly, with spinal nerve c at the posterior boundary of the occipital region.

In the nearly completed synarcuum of stage-34 specimens (Figure 3.2C), ventral (2-5) and dorsal (1-5) foramina are formed by the presence of cartilaginous bridges between the median portions of the neural hemiarches. Single large foramina are present between neural arches 5-9. The distal portions of neural hemiarches 1-6 have grown medially toward each other and appear fused with the synarcual plate over the notochord, thus forming the anterior dorsal surface of the synarcuum. This surface is pointed over neural arches 1, wider in the middle over neural arches 2-4, and narrower posteriorly. Neural arches 11 have their distal extremities fused with neural arches 10. The ventral extremity of neural hemiarches 1-9 has fused with the ACVS, which have joined ventrally and completely surround the ventral surface of the notochord. The lateral ventral extensions of the ACVS are clearly defined and articulate with the dorsal processes of the compound pharyngobranchials/epibranchials of the branchial arches (as defined by Gillis *et al.*, 2011). The DFAC have elongated, their distal extremity articulating more tightly with the anterior region of the first dorsal fin; large openings are present between the DFAC and the synarcual plate. The synarcual plate is expanding dorsally.

The occipital region of stage-35 specimen is lightly stained and cannot be properly described. Within the synarcuum of stage-35 specimens, the enlarged distal extremities of neural arch 11 are fused with the distal region of preceding neural arches. The posterior edge of the synarcual plate articulates with the anterior ventral edge of the first dorsal fin between the DFAC. The anterior edge of the synarcual plate is rounded whereas the dorsal and posterior edges are straight. The dorsal edge of the synarcual plate is slightly rounded anteriorly.

The occipital and synarcual regions of the stage-36 specimen are lightly stained and no new information could be observed. Within the occipital region of newly hatched specimens (Figure 3.2D), the occipital region is completely fused with the otic capsule. The foramina are smaller, well delineated, and are aligned one after the other in a gentle curve, with occipital nerve y and spinal nerve c placed at a slightly dorsal position compared to the other foramina (Figure 3.2D).

In the synarcual region of newly hatched specimen (Figures 3.1, 3.2D), the anterior and posterior regions of the synarcuum are fused together dorsally. The neural hemi-arches have widened, and the size of the foramina are reduced. The number of spinal nerve foramina has increased compared to previous stages. There are ventral and dorsal spinal nerve foramina associated with neural arches 1-5 and 8-9. There is only one elongated spinal nerve foramen present between neural arch 6-7 and 10-11. Neural arches 11-12 have fused with their associated basidorsals. Basiventrals 9-10 appear to be fused with the ventral cartilage of the synarcuum.

Order and direction of development

In the occipital region of the chondrocranium, the posterior extremity of the parachordals was the first element to chondrify, and nerve foramina were formed from its postero-dorsal progression. In the synarcual region, the basidorsals, neural hemiarches and ACVS were the first elements to appear, followed by elements articulating with the first dorsal fin, and ending with the formation of the synarcual plate. Within the occipital arch, the pharyngeal nerve foramina was completed before that of the vagus nerve. Direction of formation of the first three occipital nerve foramina cannot be ascertained, since they were present all at once in our sample.

Within the synarcuum, the direction of formation of the first 12 basidorsals and hemiarches cannot be ascertained, since they also were present all at once in a short period of time. The formation of the dorsal surface of the synarcuum follows a dorso-median direction. The anterior ventral cartilage of the synarcuum develops following ventro-dorsal and latero-medial directions. The basidorsals and neural arches posterior to the synarcual region appear to develop in an antero-posterior direction, which was ascertained by the lesser degree of staining, the smaller size of the posteriormost elements, and their absence posterior to the synarcuum in early stages. Fusion between neural hemiarches and basidorsals, and formation of spinal nerve foramina also followed an antero-posterior direction. The synarcual cartilaginous plate forms following a ventro-dorsal direction.

3.4 Discussion

Previous studies highlighted the lack of information pertaining to the development of the occipital and synarcual regions within chondrichthyans (Bemis et Forey, 2001 ; Britz et Johnson, 2010 ; Claeson et Hilger, 2011 ; Johanson, Carr et Ritchie, 2010 ; Johanson *et al.*, 2013). This missing information impedes the resolution of long standing embryological and developmental questions such as (1) whether the occipital and synarcual regions, although exhibiting different adult morphology, have similar morphology and development early in ontogeny; (2) what are the number and identity of the vertebral elements incorporated into the occipital region of chondrichthyans, and whether these are homologous among taxa; and finally, (3) whether the anatomical composition and development of batoid and holocephalan synarcua are different enough to justify their purported non-homology. Results show that the early developmental anatomy of the occipital and synarcual regions of *C. milii* are not similar; that there were no distinct vertebral elements observed incorporated into the occipital region; and finally that although partly composed of vertebral elements that are homologous, the synarcua of batoids and chimeras (*C. milii*) are not homologous structures.

Progression of chondrification in the occipital and anterior vertebral column regions

The first objective of our study was to verify whether the occipital and anterior vertebral column regions (comprised between the posterior boundary of the occipital region and the pectoral fins), which are morphologically dissimilar in adult stages (Johanson, 2010), display similar morphology and developmental patterns within early stages because originating from serially homologous sclerotomes. The structural composition of the occipital region and the vertebral column within the limits of the synarcuum is similar only in the very early

developmental stage 29, when no elements are formed. As of stage 30, parachordals are present within the occipital region; in stage-31 specimens, no vertebral elements are present in the occipital region, whereas basidorsals and neural hemiarches appear on the anterior vertebral column region along with the AVCS (Figure 3.2). Further development shows even more differentiation between both regions. Thus, the morphology of the occipital region and anterior region of the vertebral column are not similar during development, as was mentioned by Johanson *et al.* (2010). The presence of individual pre-cartilaginous ventral and dorsal vertebral elements in the occipital and ventral vertebral elements in the anterior ventral region of the synarcuum were however observed by Johanson *et al.* (2015) in *C. milii*. Such vertebral elements were not observed in our specimens because of the restricted window of development available, along with the fact that the specimens used were older.

The composition of the occipital region in chondrichthyans

The second objective was to compare the composition of the occipital region in *C. milii* to that of other chondrichthyans. Although description of the extant chondrichthyan cranium (complete or partial) and its development has been the topic of several studies (Balfour, 1878 ; de Beer, 1937 ; El-Toubi, 1949 ; Goodrich, 1930 ; Didier, 1995 ; Grogan, Lund et Didier, 1999 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971 ; Maissey, 2004 ; Miyake *et al.*, 1992 ; Pradel *et al.*, 2013 ; Schauinsland, 1903) only a few of these studies describe the formation of the occipital region.

In sharks, the identity of vertebral elements incorporated within the occipital region and their associated nerve foramina vary among species. In *S. acanthias*, the parachordal elongates posteriorly to the notochord, forming the occipital arch. A neural arch (basidorsal), an intercalary (interdorsal) and a centrum are added to

the occipital arch, and two hypoglossal nerve foramina are present on each side (de Beer, 1937). Holmgren (1940) also observed a close association among the occipital arch, basidorsal, and the intercalary in a 38-mm *S. acanthias* embryo, with ventral foramina for occipital nerve y and z, and a dorsal foramina for occipital nerve z along with an unidentified one. El-Toubi (1949) described a similar condition than that observed by de Beer (1937) during chondrocranium development in *S. acanthias*. Based on the description by El-Toubi (1949), Bemis and Forey (1991) suggested the presence of one or two spinal nerve foramen in *S. acanthias*. Norris and Hugues (1929) observed up to five occipital nerves in *S. acanthias*, and some specimens showed different numbers of nerves between the right and the left side. In the small spotted catshark *Scyliorhinus canicula*, the occipital arch cartilage also appears to originate from the posterior extremity of the parachordals; three occipital arches are present, with possibly up to three foramina present (de Beer, 1937), although Holmgren (1940) only mentioned two.

In the Port Jackson shark *Heterodontus portusjacksoni*, two vertebral segments and a centrum appear to be incorporated within the occipital region, and three ventral foramina are present (de Beer, 1924 ; 1937). In the blackmouth catshark *Galeus melastomus*, three vertebral segments, including several elements (two basidorsals, two interdorsals, three basiventrals and two interventrals) appear to be incorporated within the occipital region; two spinal nerve foramina are present (de Beer, 1937). In the velvet belly lantern shark *Etmopterus spinax*, several elements (basidorsals, basiventrals, intercalary, vertebral arches and a centrum) appear to be incorporated into the occipital region during early development; two ventral foramina are present for nerves y and z (Holmgren, 1940). Fürbringer (1897) studied the occipital nerves in elasmobranchs and determined that they varied from zero to five.

There is less information on the occipital region of batoids compared to sharks. There are no spinal nerve foramina piercing the occipital region of the thornback skate *Raja clavata* (Holmgren, 1940). In the round stingray *Urolophus halleri*, there are two ventral occipital nerve foramina in a 31-mm specimen; a dorsal one corresponding to the dorsal root of the spinal nerve z is also present in a 33-mm specimen but absent in a 49-mm specimen (Holmgren, 1940). In a 24.5-mm specimen of the common torpedo *Torpedo torpedo*, Holmgren (1940) mentioned the presence of a foramen for spinal nerve z, but that spinal nerve y and its foramen have disappeared. There are, however, two occipital nerve foramina illustrated on a 63-mm specimen.

Stahl (1967) mentioned that two or three vertebral elements were incorporated into the occipital region of the Holocephali. Ma *et al.* (2010) observed four occipital foramina for *Hydrolagus colliei*. Schauinsland (1903) described six ventral and one dorsal foramina within the occipital region of the chimaera *C. antarticus*. In *C. milii*, no distinct vertebral elements were observed being incorporated into the occipital region; the only elements present in the occipital region appeared to be the parachordals, similar to what was observed in early stages of *S. acanthias* (de Beer, 1937 ; El-Toubi, 1949) and the nerve foramina. A total of five ventral and one dorsal spino-occipital nerve foramina were observed in the largest specimen (ANSP 174713). The position of spinal nerve foramina observed in the occipital region of *C. milli* are in agreement with illustrations of *C. antarticus* made by Schauinsland (1903), but *C. milii* has one less ventral foramina. Fürbringer (1897) observed five nerves in the occipital region of *Chimaera* and four in *Callorhinchus* and determined that only the first two occipital nerves in the chimaeras resembled those in elasmobranchs; the remaining were identified as spinal nerves innervating the brachial plexus (as reported in Stahl, 1967).

Therefore, although the composition of the occipital region includes homologous vertebral elements across species, this region also shows variability in the identity and number of elements incorporated. The occipital region (occiput) of chondrichthyans thus does not appear to be homologous as hypothesized by Britz and Johnson (2010), since the identity and number of vertebral elements are different among taxa.

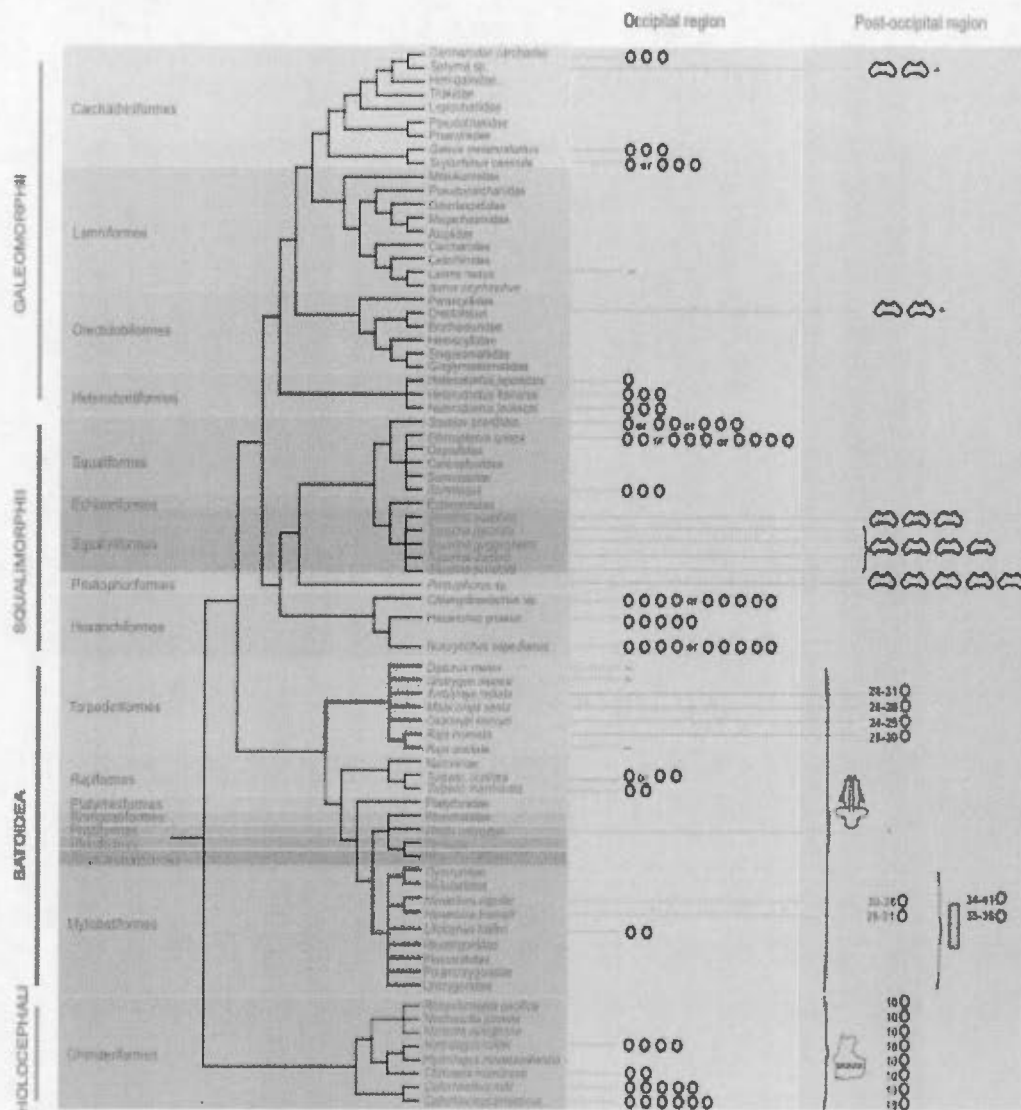
We surveyed, from the literature, the number of ventral occipital and spinal nerve foramina present in the occipital region along with the presence of a synarcuum (or other modified vertebral morphology) among various chondrichthyan species (Figure 3.3). Beside the number of spino-occipital nerve foramina, Bemis and Forey (2001) proposed several landmarks in order to infer the number of neural arches incorporated into the occipital region of fish, such as the presence of occipital ridges marking the insertion of myosepta, the presence of segmental arteries, and the presence of ribs or intermuscular bones. Britz and Johnson (2010) used myosepta arrangements in order to count the number of vertebral segments incorporated into the cranium, and warned against the use of spino-occipital foramina as landmarks for vertebral segment counts since more than one nerve may exit from a foramen and intraspecific variation is often observed (e.g., *S. acanthias*). Therefore, the number of spino-occipital foramina may not reflect the number of vertebral segments incorporated into the occipital region for several reasons. The presence of these foramina may vary according to the developmental stage of the specimen, as was observed by Holmgren (1940) for the dorsal foramina of nerves y and z in *S. acanthias* and for the foramen of nerve y in *T. ocellata*. Also, when the occipital region is short, the spino-occipital nerves may be confined to the glossopharyngeal foramen (Maisey, 2005). The use of spino-occipital foramina as landmarks indicating the number of neural arches or vertebral segment incorporated into the cranium may not be the most accurate one, and ideally complete ontogenetic series should be used. But when these

series are not available, the number of spino-occipital ventral foramina is often the only accessible approach left for estimation; these foramina are macroscopic features that are usually easy to identify. Again, ideally, the age or stage of the specimen should be known in order to standardize the data, but these are rarely available.

The number of foramina present in the occipital region of chondrichthyans, whether mentioned in text or illustrated, were used to estimate the minimal number of vertebral segments incorporated into the cranium, unless the exact number of incorporated vertebral elements was mentioned. The presence of a modification in the anterior region of the vertebral column is also reported. This review simply represents an exploratory method to illustrate little-synthesized information from the occipital region in chondrichthyans. Morphological variations in anteriorly-positioned vertebrae were placed within a phylogenetic framework in order to discern general trends and the amount of disparity between taxa (Figure 3.3).

The number of foramina (0-6) varies greatly among chondrichthyans (Figure 3.3). In sharks, the Hexanchiformes have especially long occipital regions with low intrageneric variation (4-5 segments), compared to the high variation (1-4) observed within the Squaliformes; further investigation should be made in *S. acanthias* and *Etmopterus spinax* in order to confirm whether this degree of variation is generally associated with these species. Batoids have short occipital sections (short = 0-2 vertebral segments incorporated) with long cervicothoracic and thoracocolumbar synarcua. In chimaeras, the number of foramina incorporated within the occipital region varies among families (2-6), and although the number of vertebral segments fused into the synarcual was reported as similar among species (10), we observed the partial fusion of neural hemiarches 11 to the synarcua, as was also observed by Johanson *et al.* (2013) in *C. monstrosa*. A

compacted occipital region is common to batoids and chimaeras, and may be associated with the durophagous diet common to these two groups; this fusion of elements may also obscure the ancestral condition (Stahl, 1967). Similarly, Maisey (2007) also observed that the number of foramina was not correlated with length of the occipital region in fossil shark species.



Legend:

- = absent

+ = and more

o = ventral foramen

= expanded basiventral



= idealized batoid cervicothoracic synarcium



= idealized batoid thoracocolumbar synarcium



= idealized chimaerid synarcium

Figure 3.3. Phylogenetic synthesis illustrating the number of occipital and synarcua foramina and morphology of postcranial vertebrae present in chondrichthyans. Cladogram taken from Heinicke *et al.* (2009). Species are listed with the bibliographic source given in parentheses: Sharks: *Carcharodon carcharias* (Gardiner *et al.*, 2012); *Chlamydoselachus* sp. (Hawkes, 1906); *Etmopterus spinax* (Holmgren, 1940); *Galeus melanostomus* (de Beer, 1937); *Heterodontus francisci* (Daniel, 1914); *H. japonicus* (Holmgren, 1940); *H. philippi* (de Beer, 1937); *H. griseus* (Daniel, 1934); *Lamna nasus* (Garman, 1913); *Notorynchus cepedianus* (Daniel, 1934); *Orectolobus* (Claeson et Hilger, 2011); *Pristiophorus* (Claeson et Hilger, 2011); *Scyliorhinus canicula* (de Beer, 1937); *Somniosus* (Hawkes, 1906); *Sphyrna* (Claeson et Hilger, 2011); *Squalus acanthias* (Daniel, 1914 ; de Beer, 1937 ; El-Toubi, 1949 ; Holmgren, 1940 ; Jollie, 1971); *Squatina dumeril* (Claeson et Hilger, 2011); *S. guggenheim* (Claeson et Hilger, 2011); *S. japonica* (Claeson et Hilger, 2011); *S. punctata* (Claeson et Hilger, 2011); *S. squatina* (Claeson et Hilger, 2011). Batoids: all batoids have a synarcuum, Myliobatiformes have two synarcua (Compagno, 1999). *Amblyraja radiata* (Claeson, 2011); *Dipturus menni* (Moreira, Gomes et de Carvalho, 2011); *Himantura signifer* (Compagno et Roberts, 1982); *H. krempfi* (Compagno et Roberts, 1982); *Malacoraja senta* (Claeson, 2011); *Pristis microdon* (Garman, 1913); *Raja inornata* (Claeson, 2011); *R. ocellata* (McEachran et Martin, 1978); *Torpedo ocellata* (Holmgren, 1940); *T. marmorata* (de Beer, 1937); *Urotrygon daviesi* (Nishida, 1990); *Urolophus halleri* (Compagno et Roberts, 1982 ; Holmgren, 1940). Holocephali: all extant chimaeras have a synarcua (Didier, 1995 ; Stahl, 1967): *Callorhynchus antarticus* (Schauinsland, 1903); *C. milii* (Didier, 1995 ; this study); *Chimaera monstrosa* (Johanson *et al.*, 2013); *Hydrolagus colliciei* (Ma *et al.*, 2010).

Maisey (2005) suggested that three to five canals (foramina) may represent a plesiomorphic condition, whereas one or two foramina may represent a derived condition in elasmobranchs. This is similar to the plesiomorphic condition suggested by Bemis and Forey (2001) and Britz and Johnson (2010) in actinopterygians, which was the incorporation of three vertebral segments. Even though the plesiomorphic condition for extant chondrichthyans cannot be inferred from this framework, the information tends to agree with the hypothesis brought forward by Maisey (2005).

The morphology of the anterior region of the vertebral column also varies among chondrichthyans (Figure 3.3). Although selachians do not possess a true

synarcuum, some members of the Squatiniformes, Orectolobiformes, Carchariniformes and Pristioforiformes possess modified post-cranial vertebrae (Claeson et Hilger, 2011). These are located immediately behind the cranium and have laterally expanded basiventrals that articulate with the occipital condyle. These elements usually remain unfused, and can be counted. This is not the case for the synarcuum of batoids and chimaeras, and thus the number of vertebral segments incorporated was estimated on the number of spinal nerve foramina observed. There is a second synarcuum present in the Myliobatiformes, the thoracocolumbar synarcuum, which may abut or be separated from the cervicothoracic synarcuum (Compagno, 1999). Therefore, as is observed in other groups, the anterior portion of the vertebral column can be modified independently (see below) in chondrichthyans, and this region shows a high degree of disparity, as observed within other gnathostome groups (Johanson, 2010 ; Morin-Kensicki, Melancon et Eisen, 2002 ; Müller *et al.*, 2010).

Thus, from this review, it appears that the number of vertebral segments incorporated into the occipital region of chondrichthyans varies greatly. The modified morphology of the anterior postcranial region observed in sharks, batoids and holocephalans may reflect the possible functional adaptations within certain groups as was suggested by Claeson and Hilger (2011) and Johanson *et al.* (2013). This, however, does not exclude the presence of phylogenetic constraints within orders (e.g., Hexanchiformes), and more detailed information is needed in order to understand their influence on chondrichthyan cranial and post-cranial morphology.

Further analyses should also include the incorporation of fossil species in order to better understand the plesiomorphic condition of these regions within extant and extinct chondrichthyans. Maisey (2007) mentioned that caution should be exerted when using fossil species, since the number of foramen observed was not

necessarily representative of the original condition, as a result of taphonomic conditions.

Non-homology of the batoid and chimaera synarcua

The third objective was to validate whether the batoid and chimaera synarcua are homologous structures. Both synarcuum have been described as the result of the fusion and modification of individual anterior vertebral elements (Compagno, 1999 ; Didier, 1995 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Miyake, 1988 ; Stahl, 1967) and not from a failure of proper vertebral segmentation (Johanson *et al.*, 2015). They are considered non-homologous structures (Johanson, 2010 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Maisey, 1986 ; Patterson, 1965), because morphological differences include pectoral processes that are present in the horizontally-compressed batoid synarcuum, but not in the laterally-compressed chimaera synarcuum. However, lateral extensions are present on the chimaera synarcuum at the same position that lateral stays are on the batoid synarcuum. Functionally, the batoid synarcuum supports the pectoral fins whereas the chimaera synarcuum articulates with the first dorsal fin in order to control it along with its spine (Compagno, 1999 ; Didier, 1995 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Lund et Grogan, 1997 ; Maisey, 1979). Also, in the batoid synarcuum, there is a free vertebral centra in the posterior region of the synarcuum (but none anteriorly), whereas chimaeras do not have true centra within their vertebral column (Compagno, 1999 ; Didier, 1995 ; this study).

However, because early ontogenetic stages of synarcuum formation are rendered undistinguishable by subsequent growth (Johanson *et al.*, 2013), complete ontogenetic series, which include early embryonic stages of batoids and chimaeras, are necessary for assessing the ontogenetical criteria to identify homology (Raff, 1999).

Few studies have looked at the early ontogeny of the synarcuum in batoids. Miyake (1988) described the formation of the synarcuum in three species of batoids (*Leucoraja erinacea*, *Narcine brasiliensis*, *Urotrygon venezuelae*). Development of the synarcuum of *L. erinacea* was observed in two specimens (53 and 55 mm). At first, no structures are associated with the notochord within the limits of the synarcuum, except for laterally expanded projections; there are, however, basal cartilages and inter dorsals present posterior to the synarcuum limits. These basal elements will subsequently form basidorsals and basiventrals first, and then ribs and haemal arches. Inter dorsals are separate elements alternating with the basals, within the posterior region of the synarcuum. Dorsal spinal foramina are formed from holes within the dorsal extremity of the basiventrals and ventral foramina are formed by holes in the ventral extremity of the inter dorsals; the presence of centra is not mentioned (Miyake, 1988).

The development of the synarcuum in *N. brasiliensis* is based on two specimens (34 and 36 mm) (Miyake, 1988). The notochord within the synarcuum region is at first surrounded by cartilage, and basidorsals and inter dorsals are present dorsal to the notochord (as opposed to latero-dorsally in *L. erinacea*) as small rounded cartilaginous structures. Then the dorsal portion of the synarcual chondrifies as the medial crest. Basidorsals, basiventrals, inter dorsals and several discrete centra are incorporated into the posterior portion of the synarcuum. In the single specimen of *U. venezuelae* (28 mm), the basidorsals, inter dorsals and ventral elements also chondrify *de novo*, as in *N. brasiliensis* but contrary to what was observed in *L. erinacea* (Miyake, 1988). There is no mention of the elements which contribute to the formation of spinal nerve foramina either for *N. brasiliensis* or *U. venezuelae*. Thus, the position of basal elements, their formation and the position of spinal nerve foramina differ among batoid species.

Synarcuum formation in *Raja asterias* was studied by Claeson (2011); within the

growth series studied, a short synarcuum was already present, and neural arches are incorporated in an anterior to posterior direction within the posterior limit of the synarcuum. Claeson (2011) also observed that a secondary direction of chondrification, from ventral to dorsal, was present. Once the synarcuum is formed as a single structure, there are few morphological changes observed in its shape but an increase in size. Johanson *et al.* (2013) described the synarcuum formation in the southern stingray *Dasyatis americana*; neural elements and basiventrals are added to the posterior margin of the synarcuum and basiventrals develop ventrally toward the centra. The dorsal spinal nerve foramina are formed by holes within the ventral extremity of basidorsals and ventral spinal nerve foramina are formed by holes within the dorsal extremity of basiventrals.

From these early ontogenetic stages, it appears that basidorsals, basiventrals and interdorsals differ in their position around the notochord (Johanson *et al.*, 2013; Miyake, 1988) and in their chondrification process (*de novo* or from pre-established elements) within batoids. Yet, they are considered homologous among themselves and to those of sharks. Therefore, the basidorsals and basiventrals of chimaeras, which arise *de novo* and are located dorsally and ventrally to the notochord, should also be considered homologous to those of elasmobranchs (Didier, 1995). Spinal nerve foramina within batoids are formed by holes formed within vertebral elements, including interdorsal, basidorsals and basiventrals (Johanson *et al.*, 2013 ; Miyake, 1988). This is different from what is observed in *C. milii*, where spinal nerve foramina are formed by the space present between consecutive neural hemiarches. Therefore, even though the synarcua of batoids and chimaeras share purported homologous elements (basidorsals, neural arches) early in development, their subsequent chondrification patterns differs. The information gathered from the ontogenetic series of *C. milii* corroborate and further substantiate observations and the non-homology statement made by previous workers (Johanson *et al.*, 2013 ; Miles et Young, 1977 ; Patterson, 1965).

3.5 Conclusion

The furthering of evolutionary and developmental issues has been hampered by the paucity of information pertaining to the development of the occipital and synarcual regions in chondrichthyans. The analysis of a complete ontogenetic series of the chimaera *Callorhinchus milii* has shed light on the formation of the occipital region, in which no vertebral elements were observed being incorporated. The description of the early developmental stages of the occipital region and the anterior region of the vertebral column demonstrated that these two regions differ in the identity of the elements formed and in their chondrification progress. This information, along with a review of the vertebral elements incorporated into the occipital region of other chondrichthyans, refuted the hypothesis that the composition of the occipital region is homologous among chondrichthyans, since high variability is present in the composition and identity of vertebral elements incorporated. Finally, the size series of *C. milii* also provided basis for ontogenetic comparison between the batoid and chimaera synarcual formation; a comparison of their progress in chondrification support previous claims that the synarcua of batoids and chimaeras are not homologous structures. Future work should include investigating the formation the occipital region of batoids and sharks (*S. acanthias*, notably) in order to better understand how morphological differences arise and verify whether these can be used as characters in phylogenetic analyses.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Richard Lund (Carnegie Museum of Natural History) for his valued intellectual input and insightful questions. We would also like to thank the curator and technicians at the Academy of Natural Science of Drexel University, Philadelphia for lending and packaging the specimens. We would like to thank students of the Grogan-Lund lab and

Cloutier lab for advice and help, especially with the use of microscopes and cameras. Funding provided by NSERC (RC) and Research Chair in Paleontology (RC).

CHAPITRE IV

ONTOGENETIC PROGRESSION OF MINERALIZATION IN AN ELASMOBRANCH, THE THORNY SKATE (*AMBLYRAJA RADIATA*)

Cyrena Riley¹, Richard Cloutier¹ et Eileen D. Grogan²

Affiliations :

¹ Laboratoire de Biologie évolutive, Université du Québec à Rimouski, Rimouski,
Québec, G5L3A1

² Department of Biology, St-Joseph's University, Philadelphia, Pennsylvania,
19131-1395

Contribution des co-auteurs (initiales)

Mise en place du protocole expérimental (CR, RC)

Colorations des spécimens (CR)

Récolte des données (CR)

Analyse des données (CR, RC)

Interprétation des résultats (CR, RC, EDG)

Rédaction du manuscrit (CR)

Correction et commentaire du manuscrit (RC, EDG)

Financement (RC)

Résumé

La minéralisation chez les vertébrés représente un processus important qui a subi plusieurs adaptations phénotypiques. Cette adaptabilité est reflétée dans l'endosquelette des chondrichthyens qui possède différents types de minéralisation. Cependant, très peu d'informations sont disponibles au sujet de leur progression ontogénétique comparativement aux différents types d'ossification présents chez les ostéichthyens. Bien qu'une progression générale de la minéralisation de systèmes morphologiques variés a été décrite chez plusieurs espèces, la progression ontogénétique de la minéralisation n'a jamais été caractérisée en détail sur l'endosquelette complet d'un chondrichthyen. Les types (tesserales, aréolaires), ordres, patrons (crustal, caténé) et les directions de minéralisation des éléments endosquelettiques ont été étudiés à l'aide d'une série ontogénétique de la raie épineuse (*Amblyraja radiata*). Différents patrons et directions de la progression de la minéralisation tesserale ont été observés, se produisant simultanément dans différents systèmes morphologiques. Les embryons démontrent moins d'éléments minéralisés que les juvéniles. L'ordre et la direction de la minéralisation étaient similaires entre chondrichthyens, et des tendances générales ont été observées entre les chondrichthyens et les ostéichthyens. Bien que les contraintes phylogénétiques et mécaniques n'aient pas été testées, celles-ci peuvent expliquer la raison pour laquelle ces tendances sont présentes entre deux groupes démontrant différents processus de minéralisation (ossification versus minéralisation tesserale) utilisés pour renforcer leur endosquelette.

Mots-clefs

Tesserae, minéralisation aréolaire, chondrification, ossification, patrons de minéralisation, ontogénie, série de croissance, chondrichthyen, *Amblyraja radiata*

Abstract

Mineralization in vertebrates represents an important process which underwent several phenotypic adaptations. This is reflected in the endoskeleton of chondrichthyans, which possess different types of mineralization. There is still little known about their ontogenetic progression comparatively to the different types of ossification in osteichthyans. Although a general progression of mineralization of various morphological systems has been described in several species, ontogenetic progression of mineralization for the entire endoskeleton has never been characterized in detail in a chondrichthyan. The types (tessellate, areolar), orders, patterns (crustal, catenated) and directions of mineralization of endoskeletal elements have been investigated using an ontogenetic series of clear and doubled-stained specimens of the thorny skate (*Amblyraja radiata*). Different patterns and direction of progression of tessellate mineralisation were observed occurring simultaneously in different morphological systems. Embryos showed less mineralized endoskeletal elements than juveniles. The order and direction of mineralization were similar between chondrichthyans, and generalized trends were observed between chondrichthyans and osteichthyans. Although phylogenetic and mechanical constraints were not tested, they could explain why these trends are present between two groups showing different mineralization processes (ossification versus tessellate mineralization) used to stiffen their endoskeleton.

Keywords

Tesserae, areolar mineralization, chondrification, ossification, mineralization patterns, ontogeny, growth series, chondrichthyan, *Amblyraja radiata*

4.1 Introduction

Mineralization is a process that has undergone diversification through time, which can be observed as adaptive phenotypes in vertebrates (Kawasaki, Suzuki et Weiss, 2004). Examples of these phenotypes are the processes of endochondral ossification in osteichthyans and tesserate and areolar mineralization in chondrichthyans.

The process of endochondral ossification is a highly dynamic process (McKee et Nanci, 1995), and differs from the mineralizing processes observed in chondrichthyans (sharks, skates, rays and chimaeras). Chondrichthyans are characterized by retaining their cartilaginous endoskeleton during development, which is covered during growth by a thin layer of tesserate mineralization in order to stiffen it (Applegate, 1967 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Moss, 1977 ; Ørvig, 1951). Tesserate mineralization is present on endoskeletal elements, except for the centra in which areolar mineralization is present (Kemp et Westrin, 1979 ; Grogan et Lund, 2004 ; Ørvig, 1951 ; Yucha, 1998). Superficially, tesserate mineralization appears as small tiles (tesserae) that cover the cartilaginous endoskeletal elements. These tiles are calcified structures located between the external fibrous perichondrium and unmineralized cartilaginous matrix (Kemp et Westrin, 1979 ; Moss, 1977). Although fusion between tesserae has been reported (Grogan et Lund, 2004 ; Maisey, 2013), they generally abut each other and do not fuse, allowing for lateral expansion (Kemp and Westrin, 1979). Internally, tesserae are made of an association of globular and prismatic mineralization (Kemp et Westrin, 1979). Globular mineralization may represent the early developmental stage leading to prismatic mineralization (Yucha, 1998) and is characterized by the presence of calcospherites of hydroxyapatite (Dean et Summers, 2006 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Ørvig, 1951). The prismatic mineralization of cartilage, a synapomorphy of chondrichthyans (Coates et Sequeira, 1998 ; Grogan et Lund,

2004 ; Lund et Grogan, 1997 ; Maisey, 1986, 2000), is made of very dense hydroxyapatite as to refract light (Ørvig, 1951). Areolar mineralization is only found within the centrum of the vertebrae and is layered in concentric rings of calcium phosphate hydroxyapatite which surround and constrict the unmineralized notochord (Applegate, 1967 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Moss, 1977 ; Ørvig, 1951 ; Porter *et al.*, 2006).

Although tesserate mineralization represents a developmental deviation of endoskeletal tissue formation characteristic of primitive gnathostomes (Grogan et Lund, 2004), little information is available on the progression of tesserate mineralization across the entire endoskeleton of chondrichthyans compared to the wealth of information on ossification sequences in osteichthyans (e.g., Cloutier *et al.*, 2010 ; Faustino et Power, 2001 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Mabee *et al.*, 2002). Previous investigations of the ontogenetic progress of mineralization in chondrichthyans focused on specific morphological systems such as the pectoral fins and the synarcuum (Claeson, 2011 ; Summers, Ketcham et Rowe, 2004) or gave a general overview (Benzer, 1944 ; Eames *et al.*, 2007). Yucha (1998) did a detailed analysis of tesserate mineralization within different morphological systems and described the ontogeny of the tessera.

Even though these studies represent valuable ontogenetic information, there is still no complete mineralization sequence available for the entire endoskeleton of a chondrichthyan. This is regrettable since tesserate mineralization constitutes a developmental variation of the pattern of formation of endoskeletal tissues which is characteristic of extant and fossil chondrichthyans (Grogan et Lund, 2004 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003 ; Ørvig, 1951 ; Smith et Hall, 1990). Also, since chondrichthyans are considered phylogenetically basal compared to osteichthyans (Inoue *et al.*, 2010 ; Janvier, 1996 ; Miller, Cloutier et Turner, 2003 ; Venkatesh *et al.*, 2007) they are often used to polarise gnathostome

phylogenetic characters (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Mabee *et al.*, 2002). The characterisation of mineralization progression across the entire endoskeleton of a chondrichthyan would yield the orders and directions in which mineralization proceeds, and these could be compared with the generalized ossification trends observed in osteichthyans. From these, general patterns and possible plesiomorphic conditions in the mineralization of extant gnathostomes could be inferred. The presence of phylogenetic and mechanical constraints could then be investigated.

In order to better understand the ontogenetic progression of mineralization in a chondrichthyan, a developmental sequence of the thorny skate (*Amblyraja radiata*) was assembled and described. The first objective of this study is to provide a description of the ontogenetic progress of areolar and tesserate mineralization of the entire endoskeleton of *Amblyraja radiata*. This information will then be compared to that observed in previous studies concerning chondrichthyan mineralization, and general trends will be established for chondrichthyans. The second objective is to compare this ontogenetic progression of mineralization in the endoskeleton of a chondrichthyan, taken from successive embryological stages, to the ontogenetic progression of ossification in osteichthyans. This will enable to assess whether similar developmental patterns are present. The potential influence of phylogenetic relationships and mechanical stress contributing to the patterns of mineralization in chondrichthyans will be discussed.

4.2 Material and Methods

A total of eight embryos and 14 juveniles of the skate *Amblyraja radiata* (Batoidea; Rajidae) were used to establish a growth series (Table 4.1). These specimens were caught in the St-Lawrence River (Quebec, Canada) during the annual summer surveys (2007-2011) performed by the Canadian Fisheries and

Ocean department; they were obtained through collaboration with the Maurice Lamontagne Institute. The specimens used in this study were not necessarily caught in the same year. The yolk sac specimens were considered embryos if they were in their egg cases. The remaining specimens were already hatched when caught and had no attached yolk sac. The largest male and female of these specimens in our growth series reached 23.3 cm and 21.9 cm, respectively; because sexual maturity in *A. radiata* of the St-Lawrence river is reached at a 50 cm for males and 47 cm for females (Templeman, 1987), the specimens were considered juveniles. Embryos and juveniles were further divided as early or late stages according to the progression of mineralization within their endoskeleton (Table 4.1).

Males and females were not treated separately. All specimens were first measured (total length and disk width) and then cleared and double-stained (Dingerkus et Uhler, 1977). Specimens were observed and scored using a stereodissecting microscope (Leica MZ 9.5) placed over a lighting table. A schematized endoskeleton of a juvenile specimen of *Amblyraja radiata* was reconstructed (Figure 4.1). Terminology of cranial structures follows Bustamante *et al.* (2012) and terminology of the synarcuum follows Claeson (2011). Terminology of the branchial arches follows Gillis *et al.* (2009), because the morphology of the branchial arches in *A. radiata* is similar to that of *Leucoraja erinacea*.

Table 4.1. Descriptive information for *A. radiata* specimens. The developmental stage (early or late embryo, early or late juvenile), number of mineralized structures, specimen number, disc width, total length and sex of each specimen are given. The developmental stage was ascertained according to the number of mineralized structure and general state of development.

Developmental stage	Number of mineralized structures	Specimen number	Disc width (cm)	Total length (cm)	Sex
Early embryo	6	11021402AF	2.5	8.6	Female
Late embryo	28	12052902AF	3.4	7.7	Female
Early embryo	9	12052901AM	3.9	10.1	Male
Early embryo	10	11021404AM	3.9	10.7	Male
Early embryo	1	11021403AF	4.7	10.6	Female
Late embryo	12	07121421AF	4.8	10.2	Female
Early embryo	2	11021401AM	5.6	11.5	Male
Late embryo	34	11021401AM	6	11.1	Male
Early juvenile	10	10011102AF	8.1	12.9	Female
Early juvenile	24	10011101AF	8.5	11.9	Female
Early juvenile	86	10072805AM	8.7	13.3	Male
Late juvenile	94	10090807AM	9.5	12.8	Male
Early juvenile	91	10072807AM	9.9	14.7	Male
Early juvenile	87	10072806AF	10	14.9	Female
Late juvenile	92	10090806AM	10.7	14.7	Male
Late juvenile	96	10090810AF	10.9	15.1	Female
Late juvenile	100	10072808AM	11.9	18	Male
Late juvenile	98	10090809AF	12.4	17	Female
Late juvenile	98	10090805AF	13.3	17.7	Female
Late juvenile	99	10090811AF	13.8	17.8	Female
Late juvenile	99	10120801AF	15.8	21.9	Female
Late juvenile	100	10120802AM	17.4	23.3	Male

Figure 4.1. Skeletal anatomy of an *A. radiata* juvenile. Several structures (dorsal view: right pectoral fin, left pelvic fin, left branchial arches, left and right ceratobranchial 5; ventral view: both pectoral and pelvic fins, right side branchial rays, dorsal fins) and the posterior region of the vertebral column were omitted in order to enhance clarity. Centra were shaded darker in order to distinguish them from other vertebral elements. Fin basals were shaded darker in order to distinguish them from radials. (continued on following page).

Figure 4.1. (Continued). List of abbreviations: ac = auditory capsule, af = anterior fontanelle, ao = antorbital cartilage, bc = basibranchial copula, bh = basihyal, br = branchial rays, bs = basals, bt = basiptyrgium, bts = basiptyrgial segment, cb = ceratobranchials, cb5 = ceratobranchials 5, com = compound radial, cor = coracoid bar, c-ph = ceratopseudohyal, cs = clasper, ct = centra, dr = distal radial, ds = distal segment, eb = epibranchials, e-ph = epipseudohyal, ha = heamal arch, hb2 = hypobranchial 2, hb3 + 4 = compound hypobranchial 3 + 4, hm = hyomandibula, h-ph = hypopseudohyal, hs = heamal spine, is1-2 = intermediary segment 1-2, int = interdorsals, ja = jugal arches, lip = lip of synarcuum, ls = lateral stay, mc = median crest, mds = middle segment, mk = Meckel's cartilage, mr = middle radial, ms = mesopterygium, mt = metapterygium, mts = metapterygial, na = neural arche, nc = nasal capsules, ns = neural spine, oc = occipital condyles, occ = otic capsule, oct = occipital cotyle, pa = pectoral arch, pb = pharyngobranchials, pb4 + eb5 = compound pharyngobranchial 4 + epibranchial 5, pf = posterior fontanelle, ph = pseudohyal arch, po = propterygium, pq = palatoquadrate, pr = proximal radial, ps = proximal segment, pub = pubioischiadic bar, ra = rostral appendix, rb = rib, rs = rostral shaft, sc = spiracular cartilage, scp = scapular process.

Terminology of the pelvic fin endoskeleton follows Koester and Spirito (2003); their term "element" was replaced by "segment" to avoid confusion and their term "crus and non-crus" were replaced by "anterior lobe and posterior lobe", respectively. Terminology of the remaining structures of the endoskeleton follows Compagno (1977, 1999). Serial elements were numbered proximo-distally and antero-posteriorly; for example, the first segment of the propterygium is the proximal one articulating with the pectoral girdle. Mineralization was considered present when an endoskeletal element or morphological system was stained by Alizarin red, and individual stained tesserae could be observed on the surface of the elements. A mineralization event was the presence of mineralization (areolar or tesserae) in an endoskeletal element (e.g., centrum) or part of a morphological system (e.g., proximal radials within the center of the fins) in cases where mineralization was gradual.

The sequence of mineralization was based on the presence of successive mineralization events, and described according to type, order of appearance,

patterns of distribution and direction of progression of the associated endoskeletal elements. The type refers to either areolar or tesserate mineralization. The order of appearance refers to the relative order in which endoskeletal elements mineralize. The patterns of distribution refers to the pattern (i.e., crustal, catenated) of tesserae distribution on the surface of an endoskeletal element or morphological structure (i.e., dorsal, ventral, lateral, complete). The crustal pattern is characterized by a continuous assemblage of tesserae over cartilaginous endoskeletal elements, and the catenated pattern is characterized by tesserae organized as long chains covering only part of the endoskeletal elements (usually pectoral fin radials), as was observed by Schaefer and Summers (2005). The direction (e.g., antero-posterior, bidirectionnal) was inferred from the gradual progression of mineralization within a morphological system (e.g., chondrocranium) or serially repeated elements (e.g., radials of pectoral fins) observed among ranked specimens. In order to compare trends in mineralisation to those in ossification, the order in which serial elements ossify within a morphological system was used to establish direction of ossification for osteichthyans.

Progression of mineralization was obtained by cumulating the number of mineralization events per specimen and ranking them according to size as a proxy of development. In cases where two specimens had the same number of events, their rank number was added to the following one and then divided by two (Grünbaum, Cloutier et Dumont, 2003); the resulting number was assigned to both specimens. In order to determine which growth parameter was more accurate to establish the growth series, a Spearman's correlation (r_s) was used to determine whether progress of mineralization was more highly correlated with total length or disc width. A linear regression was used to describe the relationship between log-transformed total length ($\text{Log}_{10} L_T$) and log-transformed disc width ($\text{Log}_{10} D_w$). Finally, a Pearson's correlation (r_P) was calculated on the number of mineralization event per specimen and growth parameters in order to see whether

mineralization patterns were different between embryos and juveniles. The PAST software was used for statistical analysis.

4.3 Results

The relationship between $\text{Log}_{10} L_T$ and $\text{Log}_{10} D_w$ was best illustrated by a linear model ($N = 22$; $R^2 = 0.9022$) (Figure 4.2). Although both relationships are highly significant, mineralization progress rank was more highly correlated with disc width ($r_s = 0.91009$; $p = 4.28 \times 10^{-9}$) than with length ($r_s = 0.8821$; $p = 5.71 \times 10^{-8}$), and thus disc width was used to order specimens for the growth series, along with progress rank (Figure 4.2). The number of mineralized events in embryos was distinctively less than in juveniles, and specimens were clearly grouped into two separate groups (embryos, juveniles) (Figure 4.3).

All endoskeletal elements were visible in each specimens. Describing the exact pattern of distribution of mineralization was, at times, problematic since the catenated pattern was not always easily distinguished from the crustal pattern. For example, the mineralization pattern observed on distal radials of the pelvic fin was categorized as catenated because a single tesserae chain was present, although these did not display the regular catenated pattern observed in radials of the pectoral fin (Figure 4.4). The size (disc width) at which mineralization type (areolar, tesserate) and pattern (crustal, catenated) were first observed on the endoskeletal elements of morphological systems are illustrated in Figure 4.5. The progression of mineralization is described as a generalized pattern although slight variations in the degree and position of mineralization were observed.

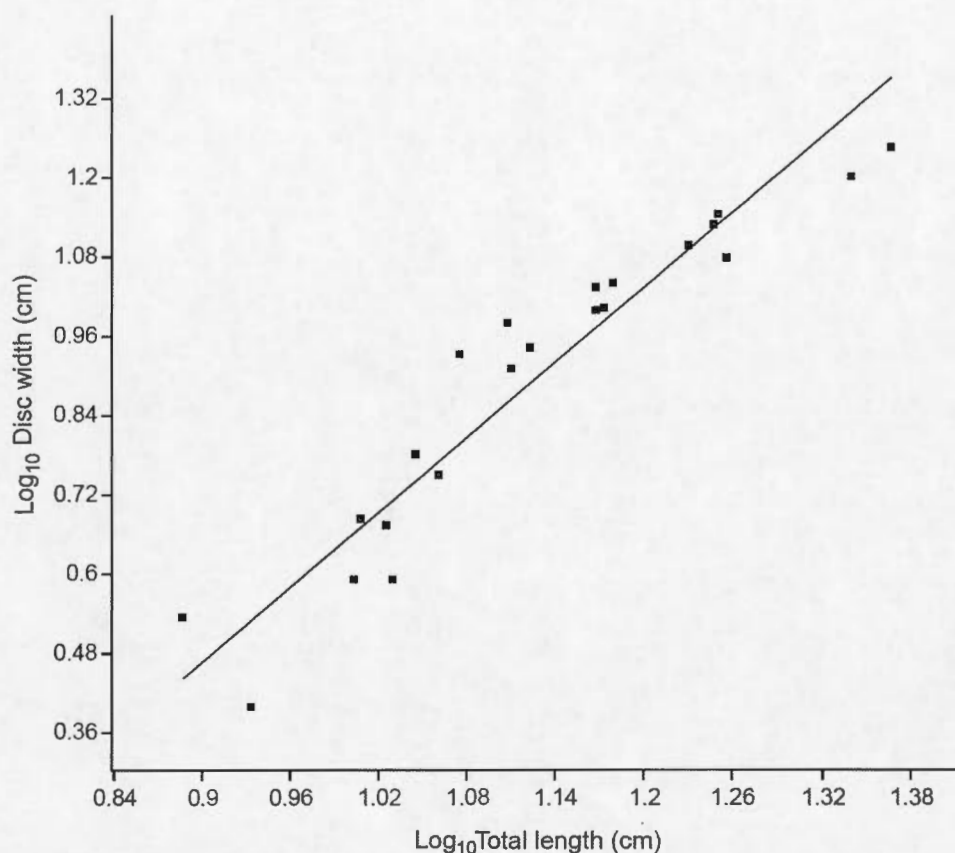


Figure 4.2. Linear regression of \log_{10} -transformed total length ($\log_{10} L_T$) and \log_{10} -transformed disc width ($\log_{10} D_w$) ($N=22$; $R^2=0.9022$) of 8 embryos and 14 juvenile specimens of *A. radiata*.

This progression is described separately for embryos and juveniles. Early embryos were characterized by having only their vertebral column mineralized, whereas late embryos had mineralization on several morphological systems, such as the chondrocranium and synarcuum. In juveniles, all morphological systems had mineralization, and differences were observed in the number of elements mineralized within these systems.

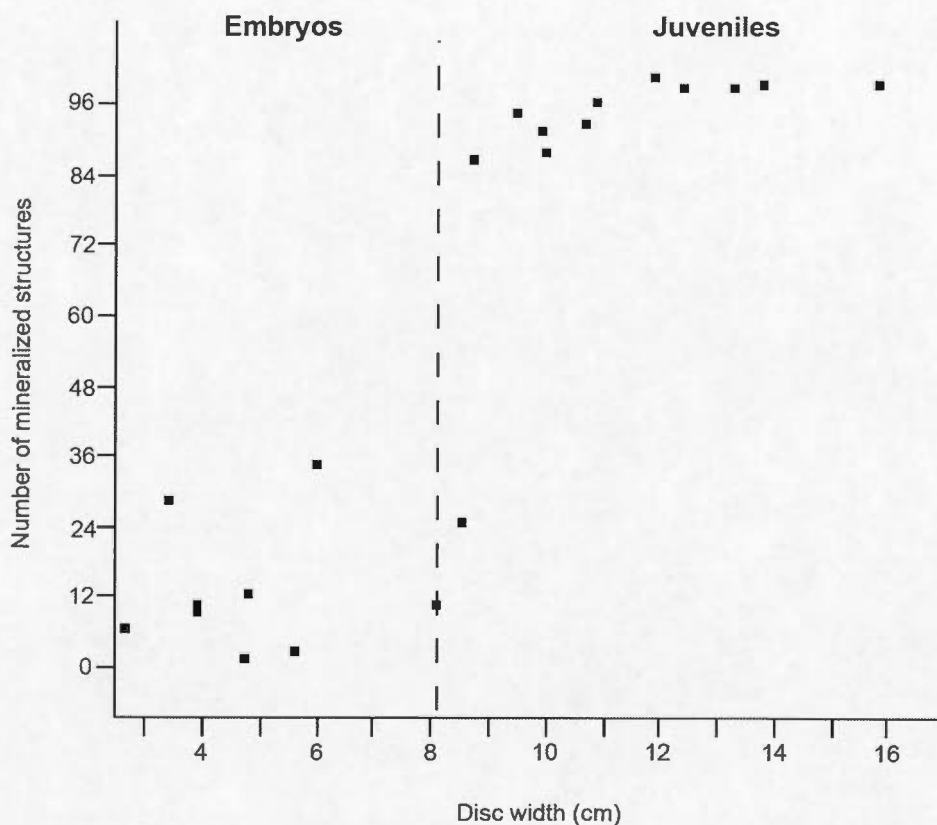


Figure 4.3. Relation between the number of mineralization events per *A. radiata* specimen and disk width (cm) ($r_p = 0.91009$; $p = 4.28 \times 10^{-9}$).

Embryos

In early embryos, the centra of the vertebral column were the only elements to have areolar mineralization; the remaining mineralized endoskeletal elements were covered with tesserae. The first elements to mineralize within the endoskeleton were those of the vertebral column; the rest of the endoskeleton was entirely cartilaginous. Among elements of the vertebral column, the centra were more extensively mineralized than the neural arches and interdorsals. Within a single centra mineralization progressed bidirectionnally, from the anterior and

posterior edges towards the center, as indicated by the narrow bands of mineralization present at these edges that became wider with mineralization until the entire centra was mineralized.

The middle caudal centra were the first elements to mineralize. The anterior limit of these mineralized centra coincided with the transitional limit between the monospondylous and diplospondylous conditions, and the posterior limit was anterior to the first dorsal fin. Centra present in the middle of this region were more mineralized compared to those located at the extremities. Centra positioned at these extremities showed thin bands of areolar mineralization present at their anterior and posterior edges only. The mineralized region within the vertebral column expanded bidirectionnally: postero-anteriorly from its anterior extremity, and antero-posteriorly from its posterior extremity. The anterior progression of the mineralized centra through the vertebral column ended when reaching the posterior edge of the synarcuum. There were no centra (mineralized or unmineralized) present within the synarcuum, only the notochord. Posterior to the synarcuum, the progression of centra mineralization extended to the second dorsal fin level; the posteriormost centra of the caudal fin were not mineralized. All centra were mineralized during the early embryonic stage.

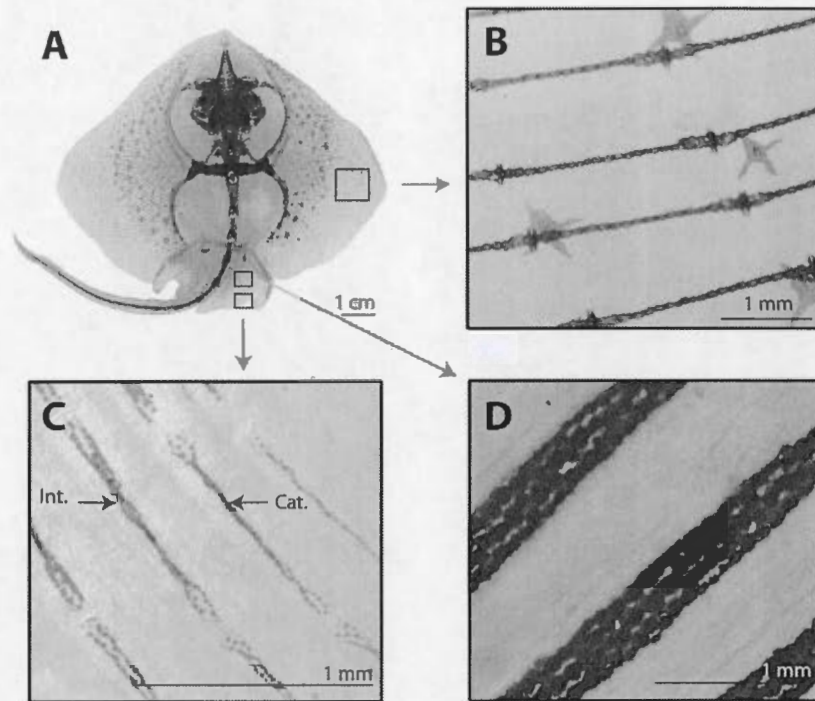


Figure 4.4. Morphology of the different patterns of mineralization in *A. radiata*. A. Specimen of *A. radiata*, with boxes showing the location of the featured patterns of tessarate mineralization. B. Typical morphology of the catenated pattern of tessarate mineralization (pectoral fin radials). C. Intermediate pattern of tessarate mineralization indicated by arrow at left and a purported catenated pattern by arrow at right (pelvic fin distal radials); Int. = intermediate of tessarate mineralization, Cat. = catenated pattern of tessarate mineralization. D. Typical morphology of the crustal pattern of tessarate mineralization (pelvic fin proximal radials).

Mineralization of the neural arches and interdorsals by tesserae occurred first on their latero-dorsal surfaces. The first elements to mineralize were at the same position where the first mineralized centra were observed. Similarly, vertebral elements located within the center of this region were more mineralized compared to those located at the anterior and posterior extremities. The neural arches were more extensively covered with mineralization, whereas only the outline of the

interdorsals were mineralized. In general, tesserae would appear first along the edges of these surfaces, and then gradually spread throughout the remaining surfaces. Mineralization of the neural spines followed. In early embryos, the dorsally located vertebral elements (neural arches, interdorsals, neural spines) displayed a crustal pattern, whereas ribs (trunk region) and haemal arches and spines (caudal region) remained unmineralized. In late embryos, ribs and haemal arches had tesserae at first only outlining their edge; tesserae eventually proceeded to cover their entire surface in a crustal pattern. Ribs and haemal arches appeared to mineralize at the same time; however, this simultaneity might result from the coarse size sampling. All elements of the vertebral column were mineralized in the largest late-stage embryo, except for the posteriormost elements, which remained unmineralized.

After the vertebral column, the chondrocranium and synarcuum were the next morphological systems to show mineralization, and both had a crustal pattern. Within the chondrocranium, tesserae first appeared on the surfaces of the occipital condyles articulating with the synarcuum, and along the adjoining lateral surfaces. Then mineralization progressed simultaneously on the dorsal, ventral and lateral surfaces, although mineralization progressed less rapidly on the dorsal surface than on ventral and lateral surfaces. Tesserae progressed anteriorly from the surface adjacent to the foramen magnum and adjoining lateral surfaces until reaching the anterior limit of the nasal capsules. The ventral surface of the cranium showed more mineralization than the dorsal surface, with tesserae present between the otic capsules and a narrow line of tesserae located anteriorly and medially on the basal plate. Dorsally, tesserae progressed on the otic capsules where dorsal surfaces were last to mineralize. The lateral edges of the rostrum were first to mineralize.

In the synarcuum, the first evidence of mineralization was found on the lip and the lateral surface between the lip and the occipital cotyles of the synarcuum. Then tesserae were observed on the entire synarcuum except for areas which remained unmineralized. These unmineralized areas were the distal edge of lateral stays, the median crest and pectoral arches dorsally, and the ventral seam ventrally. Eventually, tesserae form on the median crest and the dorsal median surface between the pectoral arches, and progressed distally on each side toward the edge of each arch. The ventral seam remained unmineralized. The synarcuum was nearly completely mineralized in late-stage embryos, and mineralization progressed more rapidly in the synarcuum than in the chondrocranium. Therefore, the vertebral column and the synarcuum were almost completely mineralized in late embryos.

After beginning in the chondrocranium and synarcuum, a crustal pattern of tesserate mineralization formed on the visceral arches. In the hyoid arch, the ventral surface of the hyomandibula proximal to the chondrocranium mineralized first, and once completely covered with tesserae, the dorsal surface began to mineralize, except for the extremities. In branchial arches, the median surface of ceratobranchial 5 mineralized first and tesserae eventually completely surrounded it. Thus both elements had complete crustal tesserate mineralization. After beginning in the branchial arches, a crustal pattern appeared simultaneously on the pectoral girdles and the first segments of the propterygium. In the pectoral girdle, the scapular processes showed greater mineralization laterally, near their articulation with the pectoral fin, than medially; the coracoid bar was completely covered with tesserae, except for the ventral condyle articulating with the metapterygia. Within the pectoral fin, tesserae were present on the proximal median surface of the first propterygial segment.

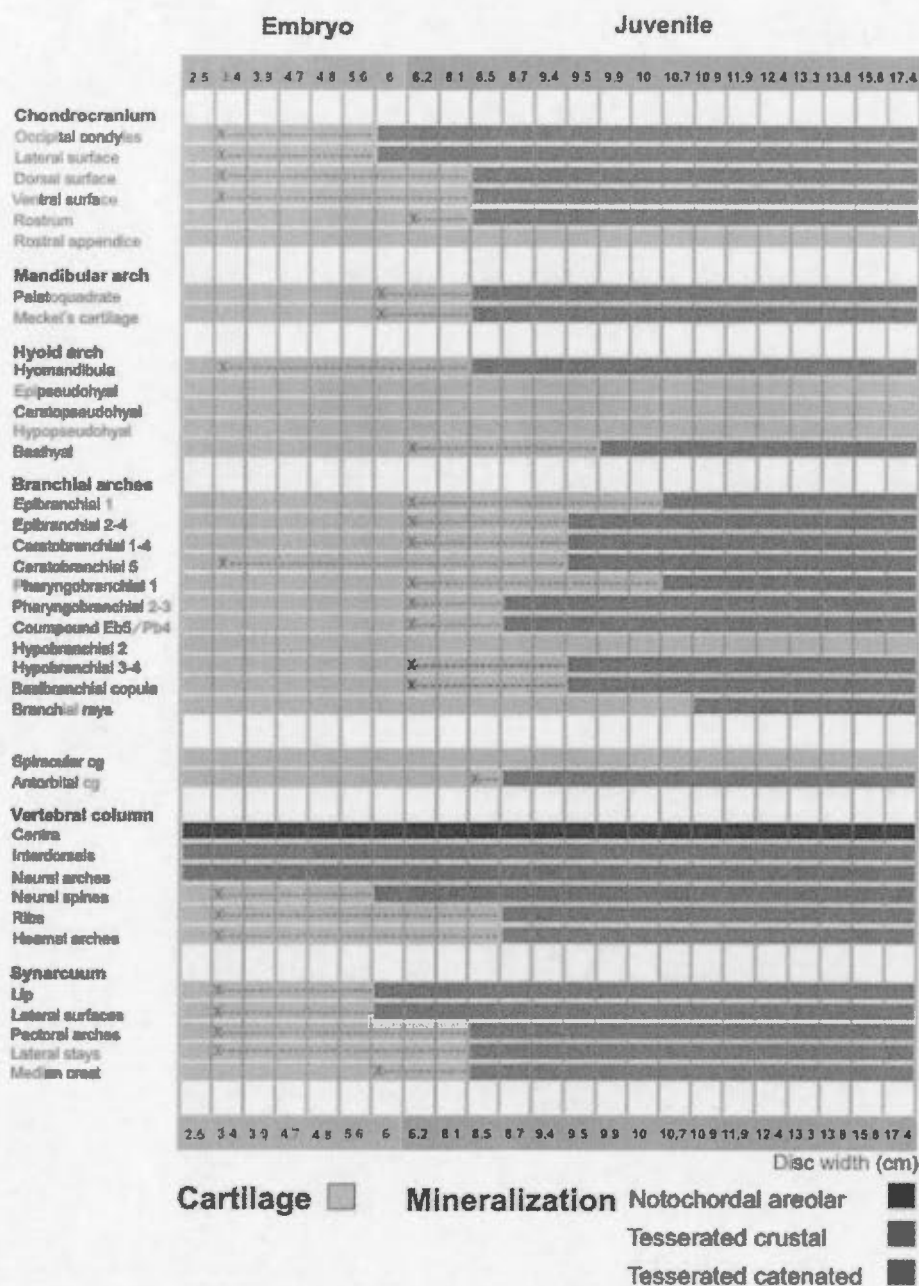


Figure 4.5. Sequence of mineralization for the elements within each morphological systems for wild-caught *A. radiata* according to disc width rank. An X precises the first presence of mineralization observed within a specimen, whereas a solid bar marks the disc width at which all subsequent specimens possess that element mineralized. Disc width in pale grey box indicates embryos,

Figure 4.5. (Continued) dark grey indicates juveniles. Blue is for cartilage, purple for aerolar mineralization, red for a crustal pattern of tesserate mineralization, and pink for a catenated pattern of tesserate mineralization. (Continued on following page).

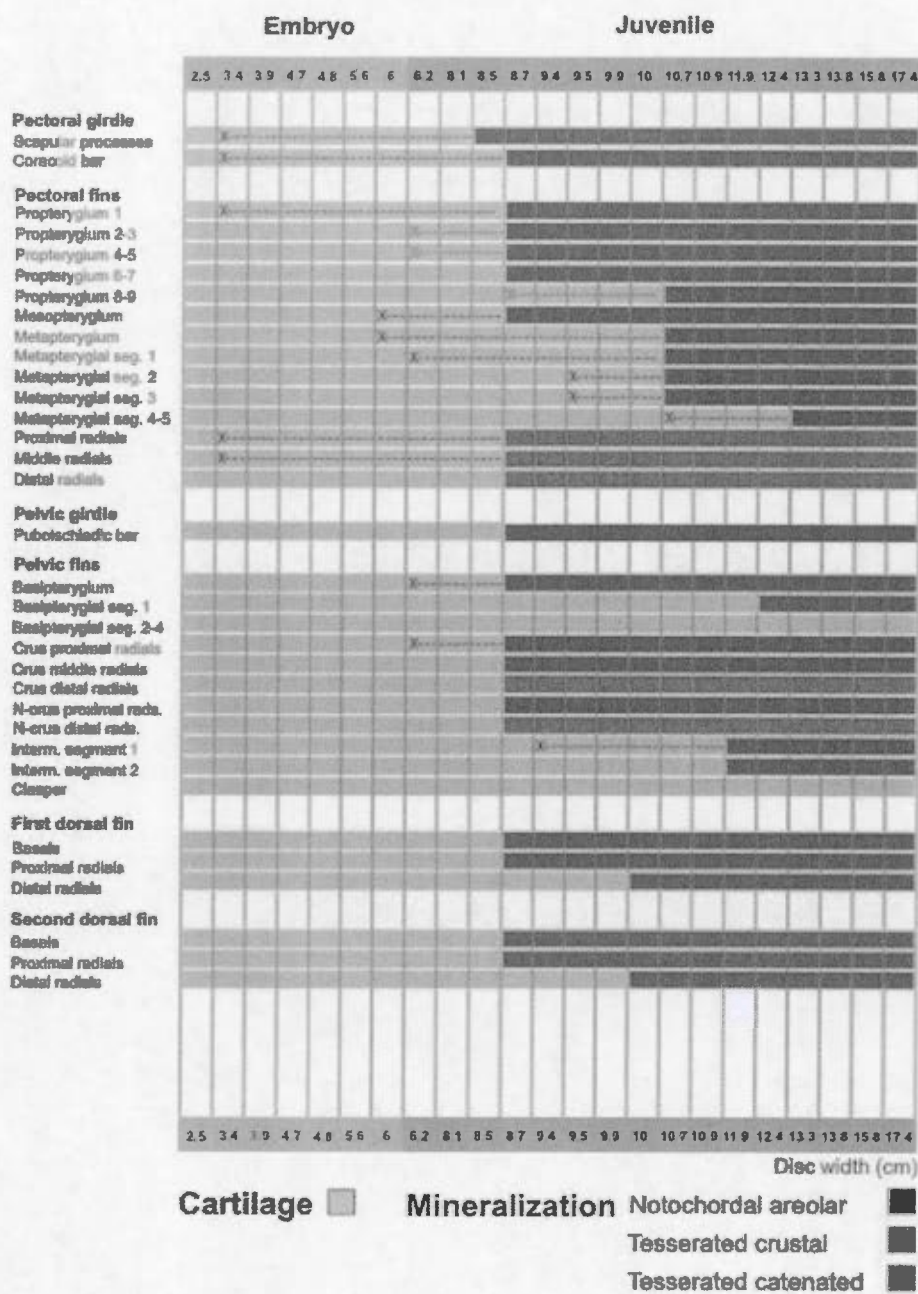


Figure 4.5. (Continued).

Thick chains of tesserae formed ventrally on proximal radials associated with the mesopterygium; thinner chains of the catenated pattern of tesserate mineralization were present on the dorsal and ventral surfaces of proximal and middle radials located within the center of the pectoral fins. The mesopterygium began mineralization after the first propterygial segment and pectoral radials, and was nearly completely covered by tesserae whereas only a few tesserae were present on the proximal end of the metapterygium. In the mandibular arch, a crustal pattern of tesserate mineralization completely covered the palatoquadrate, except for the articulating condyles. Mineralization was also present on the posterior surface of Meckel's cartilage. A crustal pattern of tesserate mineralization also appeared on the proximal surface of the jugal arches.

In embryos, both types of mineralization were present: areolar mineralization was only associated with the centra, whereas tesserate mineralization was the only other type of mineralization observed on other endoskeletal elements (Figure 4.5 and 4.6). Both patterns of tesserate mineralization were also observed in the embryos (Figures 4.5 and 4.6): the crustal pattern appeared first and was present on all mineralized skeletal elements, except for the radials of the pectoral fin where a catenated pattern was present. The first elements to mineralize were in the vertebral column; mineralization of the chondrocranium and synarcuum followed simultaneously, although the mineralization of the synarcuum was more advanced compared to that of the chondrocranium. Then mineralization began within the hyomandibula and branchial arches, and then the pectoral girdle and fins, simultaneously; the last elements to show mineralization were the palatoquadrate and Meckel's cartilage. Mineralization of the synarcuum and vertebral column was nearly completed in the embryo-stages. The patterns of tesserae distribution on endoskeletal elements were catenated on the dorso-ventral surfaces of pectoral fin radials and crustal for the remaining of endoskeletal elements (Figures 4.5 and 4.6). The direction of mineralization progression could not be ascertained for all

morphological systems (Figure 4.6). In the vertebral column, mineralization proceeded bidirectionnaly, whereas it proceeded postero-anteriorly in the chondrocranium (Figure 4.6). Clear directions of mineralization within the synarcuum were difficult to ascertain because of simultaneous events of mineralization; however, because the lateral surfaces of the synarcuum were mineralized before the dorsally located median crest and pectoral arches and ventrally located ventral seam, a proximo-distal direction of mineralization appeared present. A medio-lateral direction of mineralization was observed for the lateral stays and pectoral arches (Figure 4.6).

Juveniles

Juvenile specimens had distinctively more mineralized endoskeletal elements than embryos (Figure 4.3). There is an exception for the least advanced juvenile, which was less mineralized than late embryos. When mineralization of an element or morphological system is not mentionned, it is because its state is similar to the one previously described in embryos. Within both early and late juveniles, all elements of the vertebral column located between the posterior edge of the synarcuum and the level of the second dorsal fin were completely mineralized. Mineralization of the vertebral elements posterior to the level of the second dorsal fin progressed antero-posterioly; the centra and the latero-dorsal surface of the neural arches and interdorsals appeared to mineralize simultaneously within this section.

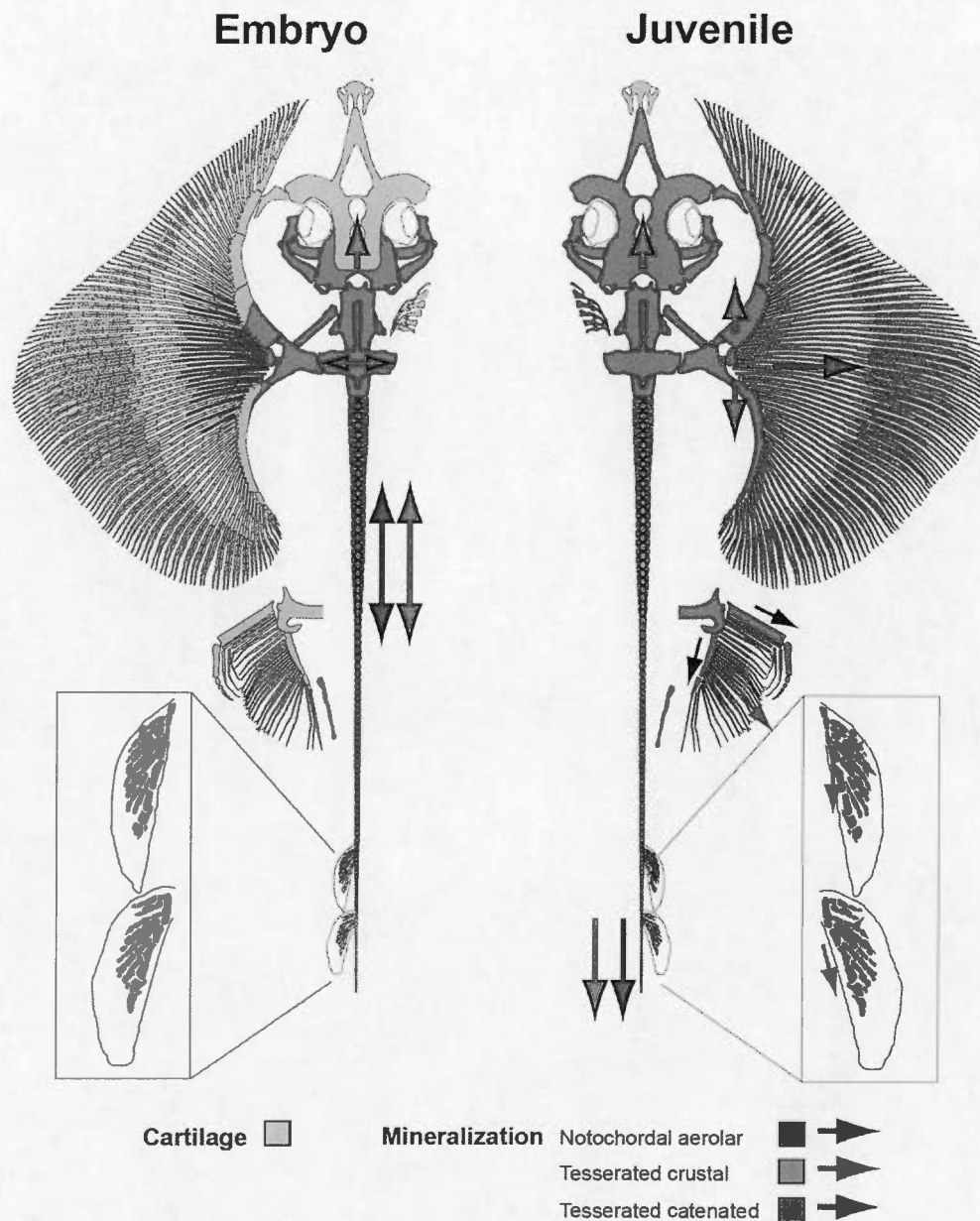


Figure 4.6. Cartilaginous and mineralized endoskeleton of *A. radiata* and directions of mineralization within the most advanced state of embryo and juvenile specimens. The type of mineralization is indicated by the color of the endoskeletal structures. Arrows indicate the direction of mineralization, whereas color of arrows indicates the type of mineralization. PD = proximo-distal direction. Blue is for cartilage, purple for aerolar mineralization, red for a crustal pattern of tesserate mineralization, and pink for a catenated pattern of tesserate mineralization.

In early-stage juveniles, most of the chondrocranium was mineralized, except for the rostral appendice which remained cartilaginous. Progression of mineralization of the chondrocranium continued to occur simultaneously on dorsal, ventral and lateral surfaces. Dorsally, mineralization proceeded from the edges of the rostrum towards the center. The only surfaces left unmineralized were the dorsal surface of the nasal capsules and the area around the anterior and posterior fontanelles, until tesserae gradually appeared around the edges of the fontanelles whereas the dorsal surface of the nasal capsules remained unmineralized. Ventrally, the entire surface of the chondrocranium was mineralized, except for the median surface in the rostrum, and the anterior surface of the nasal capsules. The lateral surfaces of the chondrocranium were nearly completely mineralized except for the median surface of the rostrum; however, tesserae were present along the edge of this surface. The posterior region of the chondrocranium was completely mineralized, except for a small region located posteriorly on the jugal arch.

In late-stage juveniles, the rostral appendice remained unmineralized. Tesserae progressed postero-anteriorly on the dorsal surfaces of the olfactive capsules, eventually completely covering them. Ventrally, mineralization progressed on the anterior surfaces of the nasal cartilages until completed. The extent of tesserated mineralization present on the lateral edges of the rostrum gradually increased, and was followed by the postero-anterior mineralization of the median surfaces; only the most anterior region of the rostrum remained unmineralized. Posteriorly, the jugal arches were completing their mineralization, except for small surfaces on their posteriormost edge. The synarcuum was completely mineralized, including the ventral seam, in both early- and late-stage juveniles. In late juveniles, the four first centra immediately following the synarcuum were gradually covered with tesserae, thus becoming partly incorporated in the synarcuum.

In early juveniles, the hyomandibula and the antorbital cartilage were completely mineralized with crustal tesserate mineralization, except at their extremities. The palatoquadrate and Meckel's cartilage were completely mineralized except for the condyles at their point of articulation. In late-stage juveniles, the surfaces of the articulating condyles between the palatoquadrate and Meckel's cartilage were mineralized. Only the hyomandibula and the dorsal surfaces of the extremities of the basihyal were mineralized among the elements of the hyoid arch. No further mineralization was observed among the elements of the hyoid arch.

Within the branchial arches of early-stage juveniles, pharyngobranchials 2 and 3 had a crustal pattern covering nearly their entire dorsal surface distally and their ventral surface proximally first, along with the compound element (PB4-EB5). The proximal surface of epibranchials 1-4 were then covered with tesserae dorsally. Ceratobranchials 5 were completely covered with tesserae, whereas ceratobranchials 1-4 had tesserae only on their ventro-lateral surface; there was, however, more mineralization present on ceratobranchials 2 and 3. The center of the basibranchial copula was mineralized dorsally and ventrally, with less mineralization ventrally. The hypobranchials 3-4 were nearly completely mineralized dorsally, with a few tesserae present ventrally. No mineralization was observed on hypobranchials 2 or on the spiracular cartilages. In the branchial arches of late-stage juveniles, pharyngobranchial 1 had very little mineralization covering it, with at most a few tesserae present on the dorsal distal surface. Ceratobranchials 1-4 were nearly completely mineralized ventrally and laterally. Tesserae were also present on the distal dorsal surface of epibranchials 1-4. The ventral surface of hypobranchials 3-4 was more mineralized. The dorsal surface of the basibranchial copula was almost completely mineralized. Branchial rays began to mineralize, first on ceratobranchials 3, then on ceratobranchials 2 and 4.

Within the pectoral girdle of early juveniles, the coracoid bar was completely

mineralized. The scapular processes were also nearly completely mineralized, except for their posterior processes near the synarcuum. In early juveniles, the first two segments of the propterygium were completely mineralized except for the lateral surface associated with the pectoral fin radials. The third propterygial segment was mineralized except for its anterior median surface, and its lateral surface associated with pectoral fin radials. Propterygial segments 4-8 had less mineralization than those located proximally to the girdle (segments 1-3); tesserae were present in narrow bands along their median, dorsal and ventral surfaces. The mesopterygium was completely mineralized except for the lateral surface articulating with the radials. The metapterygium was completely mineralized, and the first segment of the metapterygium had tesserae on its dorsal and ventral sides.

In late juveniles, all surfaces of the first segment of the propterygium were mineralized. Mineralization of the third segment of the propterygium progressed proximo-distally. Segments 4 to 8 of the propterygium were more mineralized, with bands of tesserae present on their median surface, whereas their dorsal and ventral surfaces were nearly completely mineralized. Propterygial segments 9 and 10 had lines of tesserae appearing on the edge of their median, dorsal and ventral surfaces, as they gradually became more mineralized. The lateral surface of the mesopterygium articulating with the radials was mineralized. The four first segments of the metapterygium had tesserae present on their dorsal and ventral surfaces, whereas the fifth one had some on its ventral surface only.

In both early and late juveniles, all radials of the pectoral fin had a catenated pattern of mineralization, except for the distalmost radials which remained unmineralized. The extremities of radials were more mineralized when articulating with other radials or with pectoral fin basals, and tesserae exhibited a criss-crossing pattern on the surface of the radial immediately before the first

bifurcation. In early juveniles, in the anterior region of the pectoral fin, the last three distal radials were unmineralized. In the middle region of the pectoral fin, the last five distal radials were unmineralized, and in the posterior region, the last seven distal radials were unmineralized. In late-stage juveniles, mineralization progressed proximo-distally in the pectoral fins; however, the distalmost radials remained unmineralized.

In early and late juveniles, the puboischiadic bar forming the pelvic girdle was completely mineralized with a crustal pattern of tesserate mineralization, except for the condyles articulating with the basipterygium and first proximal segment (compound radial) of the crura. In both early and late-stages juveniles, the basipterygium was completely mineralized with a crustal pattern, except for its extremities. The first basipterygial segment had a crustal pattern on its median surface only; in late juveniles, this mineralization spreaded on the entire element in females. In the largest late-stage juvenile male, all proximal and middle elements had a crustal pattern of mineralization whereas distal segments had a catenated pattern of tesserate mineralization. The only exception were radials within the first distal segments which had a crustal pattern.

In the pelvic fins of early juveniles, the first proximal segments (compound radials) and their associated middle segments were completely covered by a crustal pattern. The three first radials of the first distal segment had a crustal pattern on their anterior surfaces and extremities; mineralization then progressed to the fifth radials. The remaining distal radials had no mineralization. The second proximal segment of the anterior lobe had a crustal pattern only on its distal anterior surface, whereas the third and fourth proximal radials had a crustal pattern on all their surfaces except for their posterior one and their extremities. Mineralization was present on the anterior surface of the second, third and fourth middle segments, with a few tesserae also present on their posterior surface. A

catenated pattern was present only on the anterior surface of the first radials of the second and third distal segment; other radials remained unmineralized.

In the pelvic fin of late juveniles, a crustal pattern was present on the proximal extremity of the sixth radial within the first posterior segment. A catenated pattern of tessellate mineralization proceeded to the anterior surface of the first five radials of the second distal element, although a few tesserae were present on the posterior surface of the first radial. A catenated pattern was also present on the anterior surface of the first five radials of the third distal segment; tesserae were first present on the anterior surface of the first radial of the fourth distal element, and then proceeded to the fourth radial. In early-stage juveniles, within the posterior lobe of the fin, a crustal pattern was present on the dorsal and ventral surfaces of all proximal radials except for the two posteriormost ones, which were unmineralized. A catenated pattern of tessellate mineralization was present on distal radials. The three first distal radials were mineralized on their ventral surface for the entire posterior lobe. No tesserae were present on the distalmost radials. In late juveniles, the two posteriormost proximal radials had a few tesserae present on their dorsal surface. The catenated pattern progressed to cover the ventral surface of the first five distal radials and a few tesserae were present on the dorsal surface of the sixth distal radials.

In early juveniles, a crustal pattern of tessellate mineralization was present on the lateral surfaces of the proximal basals of the first and second dorsal fins. A crustal pattern was also observed on the lateral surfaces of radials located in the proximal center of both fins. In late juveniles, the first two basals were completely covered with tesserae, and tesserae gradually covered the radial lateral surfaces located anteriorly, posteriorly and distally within the fin. Although the patterns and distribution of mineralization observed in both fins were highly similar, mineralization of the second dorsal fin slightly lagged behind the first dorsal fin.

Mineralization : forms, patterns and order

Aerolar mineralization was only observed within the centra of juvenile specimens, as in embryos. Tesserated mineralization was present more extensively throughout the endoskeleton of juveniles than in embryos (Figures 4.5, 4.6). A catenated pattern of tessellate mineralization was only observed on the distal radials of pectoral and pelvic fins, the remaining elements exhibiting a crustal pattern (Figures 4.5, 4.6). In juvenile specimens, the elements that mineralized earlier were the palatoquadrates and Meckel's cartilages, the pelvic girdle, the pelvic and dorsal fins. The patterns of mineralization within all radials of the pectoral fins and of the posterior lobe of the pelvic fin was dorso-ventral crustal pattern. In the anterior lobe, the first proximal segments and middle segments had a complete crustal pattern, whereas a crustal pattern was present on the extremities only of the first distal segment. All other proximal radials of the pelvic fin anterior lobe had a crustal pattern of mineralization on all surfaces except the posterior one. The middle and distal segments had mineralization on their anterior surface, although some posterior mineralization was observed. The first two basals of the first and second dorsal fins had a complete crustal pattern, whereas all other basals and radials had a crustal pattern only on their lateral surfaces.

Directions of mineralization

Directions of mineralization are illustrated in Figure 4.6. The direction of mineralization of the vertebral column was antero-posterior for the remaining unmineralized elements. Mineralization proceeded postero-anteriorly in the chondrocranium. Direction of mineralization could not be clearly ascertained for the branchial arches. The propterygium, metapterygium and basipterygium and their associated segments mineralized proximo-distally. All pectoral and pelvic fin

radials also appeared to mineralize proximo-distally. Proximal and middle radials of the pectoral fin mineralized first. Mineralization of both dorsal fin basal elements progressed proximo-distally. Both dorsal fin radials mineralized proximo-distally and bidirectionnally, with radials in the center of the fins mineralizing first, followed by those in the posterior and anterior regions of the fins.

4.4 Discussion

The description of the sequence of mineralization of the endoskeleton of a growth series of the thorny skate *A. radiata* has yielded previously new ontogenetic data for a chondrichthyan. The order and direction of progression for both aerolar and tesserate mineralization was described for the first time within the entire endoskeleton of embryonic and juvenile specimens. Furthermore, distribution patterns of tesserate mineralization were also observed and described. This information can now be compared to the one observed by previous workers for other chondrichthyan species in order to ascertain whether generalized mineralization patterns are present. Furthermore, trends observed in chondrichthyans can be compared to those reported for osteichthyans. The presence of phylogenetic and mechanical constraints were also investigated.

Progress of mineralization in chondrichthyans

The mineralization of the batoid synarcuum was investigated by Claeson (2011) in five extant (*Okamejei kenojei*, *Amblyraja radiata*, *Leucoraja erinacea*, *Leucoraja naevus* and *Malacoraja senta*) and one extinct (*Cyclobatis* sp.) species of skates. A complete crustal pattern of tesserae mineralization was observed in the synarcuum and occurred late in development compared to the rest of the endoskeleton, progressing lateral to medial. Mineralization of the basiventrals progressed following multiple directions: from lateral to medial and anterior to posterior in certain regions of the synarcual (Claeson, 2011). In the present study, the synarcuum of *A. radiata* mineralized early in development. Several directions of mineralization were observed in the synarcuum, including both general antero-posterior and postero-anterior directions. Thus, the type, pattern and distribution of mineralization of *A. radiata* are similar to those observed in other batoids by Claeson (2011). However, the order and directions of mineralization appear different, except for the ventral seam which mineralized following an antero-posterior direction.

Johanson *et al.* (2013) described the chondrification process of the synarcua of four batoid species (*Dasyatis americana*, *Raja texana*, *Rhinobatos lentiginosus*, *Torpedo torpedo*) from cleared and double-stained embryos. Although they did not discuss mineralization progression, it can be partly ascertained from specimens in their figures 6 and 7 (Johanson *et al.*, 2013). When analyzed, these figures show that mineralization within the embryos is present at specific locations only (chondrocranium, synarcuum, vertebral column) and that all centra are mineralized. The synarcuum is not mineralized in *D. americana* and the chondrocranium is not figured. The posterior edge of the chondrocranium and anterior edge of the synarcuum are mineralized within specimens of *R. lentiginosus* and *T. torpedo*. In *T. torpedo*, the posterior edge of the synarcuum is

also mineralized. Mineralization is more advanced on the specimen of *R. texana*, and covers the posterior surfaces of the otic capsules, and the anterior half of the synarcuum, except for the distal portion of the lateral stays. Although the available information is incomplete, the type, pattern and order of mineralization within the chondrocranium, synarcuum and part of the vertebral column observed in embryos featured in Johanson *et al.* (2013) is similar to that observed in *A. radiata*.

Mineralization of the pectoral fins for 56 batoid species were examined according to their mode of locomotion (undulatory, oscillatory) (Schaeffer and Summers, 2005). A high amount of variation in the degree of tesserated mineralization was observed among and within species. Schaefer and Summers (2005) suggested that (1) mineralization within immature specimens progressed proximo-distally and (2) the catenated pattern of tesserate mineralization represented the neotenic state, which would be observed in juveniles of adults with a crustal pattern. A crustal pattern of tesserate mineralization is also present in sharks and thus was suggested to represent the basal character state (Schaefer et Summers, 2005). In late-stage embryos of *A. radiata*, a catenated pattern of tesserate mineralization was first observed in the proximal middle radials of the pectoral fin, and absent in distal radials. In juvenile specimens of *A. radiata*, a catenated pattern of tesserate mineralization was present in proximal and middle radials, eventually appearing on distal ones. This gradual progression of mineralization in a proximo-distal direction thus supports the first hypothesis proposed by Schaefer and Summers (2005). Their second hypothesis could not be verified since *A. radiata* does not exhibit a crustal pattern of tesserate mineralization within radials of the pectoral fin. Therefore, the types, patterns and directions of mineralization that we observed in *A. radiata* is similar to those observed for the Rajidae as described by Schaefer and Summers (2005). Preliminary data on juveniles of the smooth skate *Malacoraja senta* (pers. obs.) show that mineralization types, patterns and

distributions are also similar to those observed in *A. radiata*. Order and directions of mineralization progression in *M. senta* could not be established due to the lack of embryonic specimens, and because all juvenile specimens exhibited similar degrees of mineralization. Thus, based on previous studies and our observations, we conclude that the type, pattern, distribution and order of mineralization is conservative within the family Rajidae.

In sharks, Yucha (1998) investigated the presence of mineralization within four stages (yolk-sac embryo, prebirth embryo, subadult, adult) of *S. acanthias* at four distinct positions within the endoskeleton: the supra-orbital shelf, the Meckel's cartilage, neural arches and the centra of the 3rd and 4th vertebrae. Mineralization was first observed on the lingual side of Meckel's cartilage at the yolk-sac embryonic stage. Mineralization then proceeded anteriorly and ventrally on both lingual and labial sides of the Meckel's cartilage. The centra showed first signs of mineralization in the prebirth embryonic stage of *S. acanthias*, and was nearly entirely mineralized at the adult stage, whereas mineralization of the neural arches and supra-orbital shelf began at the subadult stage (Yucha, 1998). Centra were the first elements to mineralize (areolar mineralization) in the smallest embryonic specimens of *A. radiata*, which suggests that differences exist in the onset of areolar and tessellate mineralizations among different species of chondrichthyans.

Another study on the progress of mineralization in sharks was performed by Summers *et al.* (2004). They quantified chondrocranium mineralization in one neonate and four juvenile and adult specimens of the horn shark *Heterodontus francisci*. In the neonate, the most highly mineralized region was the jaw joint, at the dorsal surface of the palatoquadrate and the dorsal and ventral surfaces of Meckel's cartilage. The basal plate and otic region near the articulation of the hyomandibula were also mineralized, whereas the optic and olfactory regions were not. In the juvenile specimens, the optic and nasal regions along with the

posterior and dorsal surfaces of the chondrocranium had more mineralization compared to the neonate, whereas the central optic and anterior nasal surfaces remained unmineralized. In adult specimens, the nasal cartilages were well mineralized.

Eames *et al.* (2007) described the mineralization in embryos of four different lengths (5, 9, 12 and 15 cm) of the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*. The first elements to mineralize were the centra and neural arches, followed by the chondrocranium, jaws, and pectoral and pelvic girdles simultaneously; the centra and neural arches mineralized before the heamal arches (Eames *et al.*, 2007). Benzer (1944) reported that mineralization in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) was first observed within the visceral arches, followed by the cranium simultaneously with the vertebrae, and lastly within the paired fin girdles and appendages. Mineralization appeared to proceed in a congruent manner with chondrification, following a constant and specific pattern in *S. acanthias* (Benzer, 1944).

Preliminary data on cleared and doubled-stained purported embryonic (13 cm and less) and juvenile (14-30 cm) black dogfish (*Centroscyllium fabricii*) specimens show that there is no mineralization in embryos, whereas in juveniles, the vertebral column (including the caudal fin), the chondrocranium and branchial arches are the first systems to mineralize. In the vertebral column of juveniles, the centra are the first elements to mineralize, followed by the neural arches located immediately behind the chondrocranium, and then the anterior heamal arches of the caudal fin. The mineralization of centra then proceeds antero-posteriorly along the vertebral axis.

Based on previous studies (Benzer, 1944; Eames *et al.*, 2007; Johanson *et al.* 2013; Schaefer and Summers, 2005; Summers *et al.*, 2004; Yucha, 1998), our data

on *A. radiata* and preliminary data on *M. senta* and *C. fabricii*, similar patterns were found in the order and directions of mineralization. The order in which morphological systems mineralize is similar, since the chondrocranium (including the jaw and hyoid arch), branchial arches and vertebral column are the first to mineralize; mineralization on girdles and fins appears later during development. The early mineralization of the vertebral axis (including the synarcuum of *A. radiata*) and chondrocranium is similar to the condition in sharks. Within the vertebral column of *C. ventriosum*, the first elements to mineralize are the centra, followed by the neural arches, similarly to the order observed in *A. radiata*. The directions of mineralization observed previously in elasmobranchs are also in concordance with those observed within *A. radiata*. A postero-anterior direction of mineralization of the chondrocranium appears to be present in *H. francisci*. The centra, however, mineralized following a different direction in *C. fabricii* compared to the skates *A. radiata* and *M. senta*.

Chimaeras exhibit reduced mineralization of the vertebral column (Didier, 1995 ; Patterson, 1965 ; Stahl, 1967 ; E. Grogan, pers. com.) and mineralization was not observed within the endoskeleton of cleared and stained *Callorhynchus milii* embryos (Riley *et al.*, in prep.). From the information gathered from a cleared and doubled-stained chimaera embryo (*Chimaera monstrosa*) illustrated in Figure 6 of Johanson *et al.* (2013), the dorsal, ventral and posterior edges of the synarcuum of *Chimaera monstrosa* appeared last to mineralize. The lack of information pertaining to the mineralization of juvenile and adult chimaeras prevents establishing mineralization pattern common to elasmobranchs and chimaeras.

A summary of the directions of mineralization within chondrichthyans is provided in Table 4.2. Despite the scarcity of data, tentative generalized order and directions of mineralization can be inferred. The type of mineralization (areolar and tessellate) and the order of progression of mineralization observed in previous studies of elasmobranchs are generally similar to those observed in *A. radiata*. The general order in which mineralization initiates within the endoskeleton of elasmobranchs is: (1) the chondrocranium (and synarcuum within batoids), the branchial arches and the vertebral column (including the caudal fin), (2) the pectoral and pelvic girdles, (3) the pectoral fins, (4) the pelvic fins and (5) the median fins. Direction of the progression of mineralization is postero-anterior for the chondrocranium and proximo-distal for paired and median fins. Multiple directions of mineralization can be observed within the synarcuum of batoids, and the vertebral column (including the caudal fin) of elasmobranchs.

Progress of ossification within actinopterygians

The mineralization of chondrichthyans can be compared to the ossification of actinopterygians in order to investigate whether phylogenetic patterns can emerge. The types (i.e., areolar, tessellate), patterns (i.e., crustal, catenated) and distribution (i.e., ventral, dorsal) of mineralization are unique to elasmobranchs and thus cannot be compared to actinopterygian ossification. However, the order and direction in which mineralization proceeds in chondrichthyans can be compared to the order and direction of ossification in osteichthyans. Although exhibiting different processes of mineralization in their endoskeleton (tessellate and areolar mineralization in chondrichthyans and dermal, perichondral and endochondral ossification in osteichthyans), there is evidence that they are both under the control of similar molecular processes (Venkatesh *et al.*, 2014). A review of endoskeletal development in actinopterygians was performed for basal actinopterygians (Polypteriformes, Acipenseriformes), intermediate

actinopterygians (Amiiformes, Lepisosteiformes) and teleosts.

Table 4.2. Summary of mineralization and ossification directions within morphological systems of chondrichthyan and actinopterygian fishes (continued on following page).

Morphological systems	Chondrichthyes			Actinopterygii		
	Sharks	Batoids	Chimaerids	Basal	Intermediate	Teleosts
Neurocranium	P-A: 61	P-A: 30, 56	NA	NA	NA	NA
Hyoid arch	NA	NA	NA	NA	B 5: 22	B 5: 19, 35, 37, 38, 50, 53, 54, 65
Synarcium	NP	B 3: 30 A-P: 30 Multi: 10, 56	P-D: 30	NP	NP	NP
Vertebral column	B1 (c): 16, 56	B1 (c, no, lat): 56	NA	NA	A-P (c, no, lat): 22 A-P (c, no): 23	A-P (c, no, lat): 7, 28, 29, 31, 34, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 57, 63, 65, 67 A-P (no, lat): 21, 38, 41, 45, 54, 62 A-P (lat): 17, 31, 60 P-A (c, lat): 49 P-A (no, lat): 40 B1 (c): 1, 15, 26, 27, 32, 36, 40, 55, 66 B1 (no): 38 B2 (c, no, lat): 4, 5, 29, 32 B2 (c, no): 17, 60 B2 (no): 9 B3 (c): 2, 59 B3 (no): 48 B4 (no): 60 Multiple (no, lat): 2, 38, 51
Pectoral fin	P-D: 16	P-D: 56, 58	NA	P-D: 14, 39	B1: 23 P-D: 22 Rad D-V: 22	P-D: 6, 18, 32, 34, 37, 41, 48, 50, 51, 52, 54, 55, 61, 62, 65 Radial D-V: 18, 32, 33, 50, 52, 54, 61 Radiale Mid-Ext: 2
Pelvic fin	P-D: 16	P-D: 56	NA	NA	P-D: 22	P-D: 6, 41, 54 Simultaneously: 52
First dorsal fin	NA	P-D: 56 B1: 56	NA	NA	P-D: 22, 23	A-P: 2, 9, 11, 15, 18, 31, 32, 40, 44, 47, 49, 52, 53, 54 B1: 20, 32, 48, 50, 59, 62 B2: 6 B3: 60 P-D: 5, 18, 20, 25, 28, 31, 32, 40, 41, 45, 47, 48, 50, 52, 53, 54, 59, 60, 62 Dorsal: 52 Simultaneously: 8, 9, 63, 65
Second dorsal fin	NA	P-D: 56 B1: 56	NA	NA	NP	A-P: 49, 52, 53, 54 B1: 47 P-D: 52, 53, 54 Simultaneously: 47
Anal fin	NA	NA	NA	NA	P-D: 22, 23	A-P: 2 (prox. mid.), 9, 15, 18, 32, 34, 44, 49, 52, 53, 54, 59, 60 B1: 2 (dist. mid.), 11, 20, 48, 50, 62 B2: 6 P-D: 6, 9, 11, 18, 20, 25, 28, 41, 45, 47, 50, 52, 53, 54, 59, 62 D-P: 32, 37, 40 Simultaneously: 8, 37, 65
Caudal fin	NA	NA	NA	P-A (hyp): 3	A-P (c, hyp): 22, 23	A-P (c): 20 A-P (hyp): 6, 11, 17, 32, 36, 47, 48, 50, 53, 59, 60, 62, 63, 65 P-A (c): 34, 47, 51 B1 (c): 4, 6, 11, 21, 29 B1 (hyp): 22, 29

Table 4.2. (Continued). Abbreviations: anatomy: C = centra, Na = neural arch, Ha = haemal arch, Hyp = hypural, Rad = radial; directions: A-P = antero-posterior, B1 = bidirectionnal 1 (mineralization begins first in the middle elements and proceeds to the extremities), B2 = bidirectionnal 2 (C3 and C4 mineralize first, followed by C2 and C1 postero-anteriorly and C5 onward antero-posteriorly), B3 = bidirectionnal 3 (mineralization proceeds from the extremities to the middle), B4 = bidirectionnal 4 (mineralization begins anteriorly and in middle then proceeds to extremities), B5 = mineralization begins in the middle of the ceratohyal, then proceeds to extremities, D-P = disto-proximal, Multi = multiple origins and directions of mineralization, NA = not available, NP = not present, P-A = postero-anterior, P-D = proximo-distal, Rad D-V = radials mineralize following a dorso-ventral direction, Rad Mid-Ext. = middle radials mineralize first followed by those located at the extremities, Simult = elements mineralize simultaneously, Und = direction of mineralization remained undetermined. Sources: 1) Ahlstrom and Counts (1958); 2) Balart (1995); 3) Bartsch and Gemballa (1992); 4) Bensimon-Brito *et al.* (2012); 5) Benzer (1944); 6) Bird and Mabee (2003); 7) Brown *et al.* (2001); 8) Campinho *et al.* (2004); 9) Cardeira *et al.* (2012); 10) Claeson (2011); 11) Cloutier *et al.* (2010); 12) Crane (1966); 13) Cubbage and Mabee (1996); 14) Cuervo *et al.* (2012); 15) Darias *et al.* (2010); 16) Eames *et al.* (2007); 17) Faustino and Powers (1998); 18) Faustino and Powers (1999); 19) Faustino and Powers (2001); 20) Fischer-Rousseau *et al.* (2009); 21) Fraser *et al.* (2004); 22) Grande (2010); 23) Grande and Bemis (1998); 24) Grünbaum *et al.* (2003); 25) Grünbaum *et al.* (2012); 26) Gwyn (1940); 27) Houde *et al.* (1974); 28) Imamura and Yabe (1998); 29) Itawaza (1963); 30) Johanson *et al.* (2013); 31) Koumoudouros *et al.* (2001); 32) Koumoudouros *et al.* (2001); 33) Kužir *et al.* (2009); 34) Lau and Shaftland (1982); 35) Leiby (1979); 36) Lewis and Lall (2006); 37) Liu (2001); 38) Mabee (1993); 39) Mabee and Noordsy (2004); 40) Matsuoka (1997); 41) Matsuura and Suzuki (2000); 42) Mook (1977); 43) Moser and Ahlstrom (1970); 44) Omori *et al.* (1996); 45) Ott *et al.* (2012); 46) Pavlov and Moksness (1997); 47) Potthoff (1975); 48) Potthoff (1980); 49) Potthoff *et al.* (1980); 50) Potthoff and Kelley (1982); 51) Potthoff *et al.* (1986); 52) Potthoff *et al.* (1987); 53) Potthoff *et al.* (1988); 54) Potthoff and Tellock (1993); 55) Richards *et al.* (1974); 56) Riley *et al.* present study; 57) Roo *et al.* (2010); 58) Schaefer and Summers (2005); 59) Sfakianakis *et al.* (2004); 60) Sfakianakis *et al.* (2005); 61) Summers *et al.* (2004); 62) Tong *et al.* (2012); 63) Velez *et al.* (2003); 64) Watson (1987); 65) Watson and Walker (1992); 66) Weisel (1967); Wollom (1970).

Because of the important disparity of specific endoskeletal elements between actinopterygians and chondrichthyans, only the order of appearance and direction of progression of mineralization and ossification with respect to homologous morphological systems (i.e., chondrocranium, vertebral column, pectoral and pelvic fins, dorsal and anal fins) are considered. Furthermore, several bones in actinopterygians are of dermal origin (e.g., premaxilla, maxilla, opercular, cleithrum, fin rays) and ossify before cartilaginous ones (Arratia et Schultze, 1990 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Kužir *et al.*, 2009 ; Mabee et Trendler, 1996). Since there are no dermal bones in chondrichthyans, these bones were not included in the review.

The exact order in which morphological systems ossify during early development varies among actinopterygians (see supplementary informations in Appendix A). Ossification may be initiated simultaneously in the cranial and vertebral region (Kužir *et al.*, 2009 ; Velez *et al.*, 2003); ossification may then proceed more rapidly within the neurocranium (Bensimon-Brito *et al.*, 2012 ; Bird et Mabee, 2003 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Fischer-Rousseau, Cloutier et Zelditch, 2009 ; Itazawa, 1963), or similarly in both morphological systems (Velez *et al.*, 2003). Alternatively, the vertebral column may mineralize before the cranium (Liu, 2001).

Along with the cranium and the vertebral column, the caudal complex is also among the first morphological systems to ossify (Ahlstrom et Counts, 1958 ; Bird et Mabee, 2003 ; Gwyn, 1940 ; Houde, Richards et Saksena, 1974 ; Potthoff, Kelley et Javechi, 1986 ; Richards, Miller et Houde, 1974). Although the pattern of pectoral fin ossification appears conservative in various species (Campinho, Moutou et Power, 2004), the order in which paired and median fins ossify is, however, subject to variation. Indeed, the pectoral, pelvic, first and second dorsal

and anal fins may either ossify first or last. However, paired fins ossify before median fins in a majority of species.

The establishment of a specific pattern of ossification within the cranium of actinopterygians is complicated by several factors, such as the tendency of individual elements to mineralize before fusing together (Strauss, 1990). Furthermore, intraspecific variation in the order of ossification of cranial structures has been documented (Campinho, Moutou et Power, 2004 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Faustino et Power, 2001 ; Kužir *et al.*, 2009 ; Mabee et Trendler, 1996 ; Strauss, 1990). However, in general, elements associated with functional demands (respiration, feeding and locomotion), such as the premaxillary, maxillary, opercle, dentary and cleithra, are among the first elements to mineralize (Cubbage et Mabee, 1996 ; Faustino et Power, 2001).

Within the hyoid arch, the medially-placed ceratohyal tends to ossify first; ossification proceeds bidirectionally, from the center of the ceratohyal towards the extremities (B5) (Faustino et Power, 2001 ; Grande, 2010 ; Leiby, 1979 ; Liu, 2001 ; Matsuoka, 1997 ; Potthoff et Kelley, 1982 ; Potthoff, Kelley et Collins, 1988 ; Potthoff et Tellock, 1993 ; Watson et Walker, 1992). Among the branchial arches, even though no definite order or direction of ossification could be determined, an antero-posterior direction appears to be present. Within a single branchial arch, ceratobranchials tend to ossify first, followed by the more dorsally and ventrally placed elements (see supplementary informations in Appendix A).

In the vertebral column, the order in which the centra, neural and haemal arches ossify varies among actinopterygian species (see supplementary informations in Appendix A). Although several directions of ossification were documented for the vertebral column (Table 4.2), an antero-posterior direction of ossification is most common. Vertebral segments can individually begin ossifying at more than one

center of initiation, and proceed in different directions within the same species (Table 4.2). Within the pectoral fins, a dorso-ventral and proximo-distal direction of radial ossification was most common, although proximal radials were observed to ossify before distal radials in the intermediate group. In median fins, an antero-posterior direction of ossification was also the most common pattern.

The neurocranium, vertebral column (including the caudal fin) are consistently the first systems to ossify, whereas the ossification order of paired and median fin varies greatly. In the vertebral column, an antero-posterior direction of ossification was the most common one observed for intermediate actinopterygians and teleosts. An antero-posterior direction of ossification of the vertebral column was also considered as the most common pattern by Cote *et al.* (2002) for actinopterygians, and this may reflect the basal condition in extant species, since it was present in both the intermediate and teleost groups. In the paired, dorsal and anal fins, a proximo-distal direction was common to actinopterygians.

Mabee *et al.* (2002) reviewed median fin formation in actinopterygians, and considered a bidirectional development to be basal. However, the basal direction of ossification for dorsal and anal fins in extant species could not be determined because of the lack of information among basal and intermediate actinopterygians. A proximo-distal direction of ossification was observed in the dorsal and anal fins in the intermediate group and was the recurring pattern in teleosts, thus supporting a proximo-distal direction of ossification as the basal condition in extant species. In the caudal fin, an antero-posterior direction of ossification of the hypurals is most common and suggested as the basal condition in extant actinopterygians.

Generalized mineralization trends in chondrichthyans and actinopterygians

When the order and directions of mineralization and ossification are compared

between chondrichthyans and osteichthyans, the early mineralization/ossification of the vertebral column and of the neurocranium, along with a generalized proximo-distal direction within dorsal, anal and paired fins are common trends. These similarities could reflect shared genetic pathways in the mineralization and ossification processes (Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Oulion *et al.* 2012 ; Ryll *et al.*, 2014 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Similarity in the order and direction of ossification in actinopterygians may reflect phylogenetic relationships and/or response to functional needs (Bartsch et Gemballa, 1992 ; Cloutier *et al.*, 2010 ; Cote *et al.*, 2002 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Faustino et Power, 1999 ; Grünbaum, Cloutier et Dumont, 2003 ; Kužir *et al.*, 2009 ; Mabee, Olmstead et Cubbage, 2000 ; Mabee et Trendler, 1996 ; Omori, Sugawara et Honda, 1996). Structures that are required to function earlier in development usually ossify first, since bone ossification is influenced by the mechanical stresses imposed by functional demands (Adriaens et Verraes, 2002 ; Cloutier *et al.*, 2010 ; Cubbage et Mabee, 1996 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Mabee et Trendler, 1996). These phylogenetic and functional constraints may also be present in chondrichthyans.

Phylogenetic vs functional constraints in chondrichthyans

Data obtained from previous studies, the growth sequence of *A. radiata* and the preliminary observations made in *M. senta* and *C. fabricii* seem to indicate that the order of progression of mineralization is relatively conserved in elasmobranchs. However, delimiting the degree to which a phylogenetic trend or functional constraint is responsible for this consistency is not an easy task. One of the reason for this is that there are very few studies looking at phylogenetic constraints compared to the numerous studies on the effect of mechanical stress. Only Mabee *et al.* (2002) has mapped directions of ossification in actinopterygians and inferred general trends. The present study is the first review

of order and direction of mineralization in chondrichthyans, outlining common trends.

Studies on mechanical stress are comparatively more abundant. There is evidence that both the ossification and tessellate mineralization processes are induced by mechanical stress (Cloutier *et al.*, 2010 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Summers *et al.*, 2004; Yucha, 1998). Mechanical stresses can be imposed by both physiological demands (i.e., breathing, jaw movements) and in response to environmental conditions (Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012). Stresses by physiological demands are common to fish species in general, whereas environmental cues may vary according to where the embryo develops. In chondrichthyans, the elasmobranch species surveyed are either oviparous, in which case the embryo spends its entire developmental period within an eggcase (*C. ventriosum*, *H. francisci*, *A. radiata*, *M. senta*, *R. texana*) or aplacental viviparous (ovoviviparous), where the embryo develops inside the female (*S. acanthias*, *C. fabricii*, *T. torpedo*, *D. americana*, *R. lentiginosus*). Similar patterns of mineralization were observed in embryos developing within an eggcase, such as early vertebral column mineralization, followed by early mineralization of the occipito-synarcuum junction in skates. However, these patterns were also observed in batoid embryos completing their development inside the uterus of the female. This similarity in mineralization patterns observed between different reproductive strategies could indicate the presence of a phylogenetic constraint.

These similar patterns could also arise from comparable movements performed by the embryos, resulting in mechanical stress and subsequent mineralization. Chondrocytes and osteocytes are mechanically-sensitive cells that positively respond to mechanical stresses (Zuscik *et al.*, 2008). The fact that the first elements that mineralize within eggcase embryos (sharks and batoids) are the centra and associated vertebral elements is congruent with their reported enhanced

tail motility. Shark and batoid embryos developing within an eggcase move their tail from side to side in order to increase water circulation and thus oxygenation (Kempster, Hart et Collin, 2013 ; Leonard, Summers et Koob, 1999 ; Luer *et al.*, 2007 ; Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008 ; Mellinger, Wriese et Alluchon-Gerard, 1986 ; Rodda et Seymour, 2008 ; Wyffels, 2009). Motion-induced mechanical stress may also be responsible for the presence of mineralized centra within free-swimming juveniles of *C. fabricii* and its absence in purported embryos (less than 13 cm in length), since tail motion is essential for propulsion in sharks (Wilga et Lauder, 2004). Motion-induced mechanical stress may also explain the generalized increase in mineralization observed in free swimming juveniles of *A. radiata* compared to that of embryos.

Locomotion and the resulting difference in mechanical stresses may also explain the different patterns observed within the pelvic fins of skates. Skates are known to “punt”, which is the action of walking on bottom substrate using the anterior lobe of the pelvic fins to generate forward movement (Holst et Bone, 1993 ; Koester et Spirito, 2003a ; Lucifora et Vassallo, 2002 ; Macesic et Kajiura, 2010). The proximal (compound) radial of the anterior lobe moves forward and backward, whereas the posterior lobe is not involved in any direct action although it may generate lift of the fin (Lucifora et Vassallo, 2002 ; Macesic et Kajiura, 2010). The proximal (compound) and middle radials in *A. radiata* have a complete crustal pattern of tessellate mineralization, resulting in greater robustness. The remaining radials within the anterior lobe had mineralization on their anterior and posterior surfaces, reflecting their anterior-to-posterior movement during punting. These mineralization patterns are different from those observed within the posterior lobe of the fin, where mineralization was comparatively less, and only present on ventral and dorsal surfaces. This reduced mineralization could result from a less active usage of these elements. Thus, differences in location and degree of mineralization between elements may be

associated to the differential mechanical stress sustained by the two different parts of the fins.

Mechanical stress may also account for the mineralization observed on the jaws of *S. acanthias* embryos, since they perform jaw movements while still within the utero of the female. This movement could also explain the early mineralization observed on the jaw joint of embryonic *H. francisci* (Summers *et al.*, 2004) since once the embryo is too large to continue its tail beating within the eggcase, active oropharyngeal pumping has been reported (Wyffels, 2009). An assymetrical distribution of tesserae, and differences in size of tesserae were also correlated with the presence of mechanical stress (Yucha, 1998).

However, caution must be used since the correlation between mechanical stress and mineralization may also represent a tight coupling of the genetic processes ensuring that responsive tissue is present within suitable areas experiencing mechanical load (Roberts et Hartsfield, 2004). For example, the highly diverse direction of mineralization among osteichthyans was attributed to the antero-posterior direction of development controlled by *Hox* genes and the various environmental and functional constraints experienced by fish (Cote *et al.*, 2002).

4.5 Conclusion

Ontogenetic data, such as ossification sequences, can be mapped upon a phylogenetic tree in order to find evolutionary patterns among osteichthyans (Mabee *et al.*, 2000); however, the lack of detailed ontogenetic data for chondrichthyans impeded a further understanding of the progression of areolar and tesserate mineralization. Previously unknown orders, directions of progression and patterns in both areolar and tesserate mineralization were described using our growth series of the thorny skate *Amblyraja radiata*. An

antero-posterior direction of the chondrocranium appears as a common trend in elasmobranchs. Furthermore, early mineralization of the chondrocranium, branchial arches and vertebral column (including the caudal fin) and proximo-distal direction of mineralization within paired and median fins are trends common to elasmobranchs and actinopterygians, and may thus reflect commonality of embryological patterning.

Future work should include investigating the progression of chondrification and mineralization among elasmobranch species exhibiting different reproductive strategies, to understand the extent of phylogenetic and mechanical stress constraints. Another interesting system to investigate would be the use of myliobatoid species, in order to investigate directions of mineralization of their second synarcuum.

Acknowledgements

The authors would like to thank Diane Archambault, Éric Parent, Pierre-Marc Chouinard and all members of the Teleost mission of the Maurice Lamontagne Institute (DFO-MPO) for their collaboration in providing us with elasmobranch embryos through the years. Thank you to Daniel-Potvin-Leduc and Vincent Roy of the Cloutier lab for their help with the illustrations, and to Richard Lund (Carnegie Museum of Natural History) for his insightful remarks. Funding provided by NSERC to R. Cloutier.

CHAPITRE V

CONCLUSION GÉNÉRALE

5.1 Contexte, originalité de l'étude et rappel des objectifs

5.1.1 Contexte

La biologie évolutive du développement (Évo-Dévo) est une discipline dynamique, visant à expliquer comment les changements produits au cours du développement peuvent résulter dans une modification du phénotype (Hall, 2003a). Ainsi, l'ontogénie des organismes devient un outil crucial pour l'étude de l'évolution (Adriaens et Verraes, 2002). Ces changements, qu'ils soient d'ordre morphométriques (e.g., intégration morphologique), anatomiques (e.g., séquence d'ossification) ou histologiques (e.g., déposition d'os) sont caractérisés à l'aide de séquences ontogénétiques (Cloutier, 2010). Ces séquences proviennent d'organismes utilisés comme modèles (Sommer, 2009) et sont constituées de plusieurs spécimens ordonnés en niveau croissant de maturité selon un critère spécifique (e.g., stade, longueur) (Colbert et Rowe, 2008) ; ceci afin de reconstruire l'ontogénie typique à une espèce (Mabee, 1993).

L'analyse de ces séquences, et leur comparaison entre espèces sont importantes afin de détecter les changements aux niveaux morphologiques et développementaux (Sommer, 2009), et permet l'identification de patrons de développement squelettique généraux qui peuvent être associé à la présence de

modules, et la polarisation de leur état (plésiomorphe, dérivée) (Mabee *et al.*, 2002 ; Charest et Cloutier, 2008 ; Cloutier, 2010). La comparaison de séquences ontogénétiques représente un des thèmes le plus étudiés en l'Évo-Dévo (Müller, 2007), et par conséquent, le nombre d'espèces modèles utilisées à ces fins a augmenté (Bolker, 2014).

Les espèces de chondrichthyens sont devenues des modèles prisés de ce thème comparatif en Évo-Dévo car ils représentent le groupe-frère des ostéichthyens, et sont utilisées afin d'identifier les caractères et les patrons de développement plésiomorphes (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Ravi *et al.*, 2013). Cependant, malgré le fait que l'embryologie des chondrichthyens ait été un sujet d'étude depuis des siècles, des lacunes existent au niveau de la connaissance de leur développement (Mabee *et al.*, 2002). Ces lacunes concernent leur développement morphologique, puisqu'aucune série ontogénétique complète de chondrification ou de minéralisation n'avait jusqu'à présent été décrite chez un chondrichthyen.

Cette recherche de doctorat avait pour but d'augmenter les connaissances au niveau de la présence de modules, des tendances générales, des conditions plésiomorphes, et de la caractérisation de la régionalisation au niveau de systèmes morphologiques en utilisant des séquences de développement (chondrification, minéralisation) de deux espèces de chondrichthyens, la chimère-éléphant (*C. milii*) et la raie épineuse (*A. radiata*).

5.1.2 Originalité de l'étude

L'originalité de cette étude réside surtout dans le choix de 1) ses organismes modèles, 2) le nombre de spécimens analysés et 3) l'ampleur de l'analyse performée sur la progression de la chondrification et de la minéralisation chez des chondrichthyens.

Organismes modèles

Le deuxième chapitre de cette thèse représente la première description de la progression de la chondrification des nageoires paires d'un chondrichthyen, et le troisième chapitre représente la première description détaillée de la progression de la chondrification de la région occipitale du neurocrâne et du synarcuum chez *C. milii* et les chimères. À l'exception de certaines études sur la progression de la chondrification du neurocrâne (Grogan, Lund et Didier, 1999) et des arcs branchiaux (Gillis, Dahn et Shubin, 2009a ; Grogan, Lund et Didier, 1999) il n'existait aucune description détaillée sur la mise en place des éléments endosquelettiques cartilagineux et leur subséquente minéralisation des nageoires paires et de l'axe vertébral chez un chondrichthyen. Les études récentes en Évo-Dévo utilisant les chondrichthyens sont surtout concernées par la caractérisation de mécanismes développementaux moléculaires, surtout chez la chimère (Ravi *et al.*, 2013 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Il est pourtant important de connaître la mise en place de l'endosquelette car ces informations sont cruciales afin de mieux comprendre la formation des systèmes morphologiques et leur trajectoire évolutive (Gillis, Dahn et Shubin, 2009b ; Gillis *et al.*, 2011).

Le quatrième chapitre de cette thèse représente la première description de la progression de la minéralisation du squelette entier chez *A. radiata*, et la première

description détaillée chez un chondrichthyen. Les raies possèdent un squelette comprenant davantage d'éléments endosquelettiques comparativement aux autres chondrichthyens (Compagno, 1999) et représentaient un excellent choix pour la description de la progression de la minéralisation tesserale et aréolaire. La minéralisation tesserale, composée d'un assemblage de minéralisation de type prismatique et globulaire, est une synapomorphie des chondrichthyens (Grogan et Lund, 2004); cependant, sa progression sur les éléments endosquelettiques au cours de l'ontogénie n'a jamais été décrite en détail. La progression de l'ossification des ostéichthyens, par contre, a été sujette à des centaines d'études (voir Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012 ; Mabee *et al.*, 2002). Le manque d'information au niveau de la progression de minéralisation chez les chondrichthyens représentait donc une contrainte empêchant d'établir les conditions plésiomorphes des gnathostomes (Mabee *et al.*, 2002).

Nombre de spécimens analysés

Aucune autre étude portant sur la progression endosquelettique de la chondrification et minéralisation des chondrichthyens n'a analysé en détail autant de spécimens. La majorité des études concernant la mise en place des éléments cartilagineux et leur subséquente minéralisation se basent sur quelques spécimens seulement (Johanson *et al.*, 2013 ; Pradel *et al.*, 2013) ou omettent de mentionner le nombre de spécimens utilisés (Claeson, 2011 ; Eames *et al.*, 2007 ; Gillis, Dahn et Shubin, 2009a). Dans la présente étude, 25 spécimens de la chimère *C. milii* et 22 spécimens de la raie *A. radiata* ont été utilisés pour étudier la progression de la chondrification (*C. milii*) et de la minéralisation (*A. radiata*). Une séquence ontogénétique possédant un plus grand nombre de spécimens permet une description morphologique plus détaillée, et donc une identification des éléments et un suivi de leur mise en place plus précis. De plus, elle permet aussi l'identification de variations intra-spécifiques (Mabee, Olmstead et Cubbage,

2000 ; Mabee et Trendler, 1996).

La raison pour laquelle le nombre de spécimens utilisés dans les autres études est généralement limité réside dans la difficulté d'accès aux jeunes stades développementaux de chondrichthyens, comparativement aux actinoptérygiens. Plusieurs espèces d'actinoptérygiens possèdent une grande valeur commerciale, et la progression ontogénétique de leur squelette chez ces espèces a été étudiée afin de mieux connaître leur développement. De plus, certaines espèces sont élevées en captivité, rendant l'accès à des spécimens plus facile. Ceci est différent pour les chondrichthyens en général; bien qu'il existe quelque espèces élevées en captivité, leur accès demeure limité due à leur périodes de gestation et de développement, qui sont relativement plus longues comparativement à celles observées chez les actinoptérygiens. Dans le cas des chimères, ce sont des poissons vivant à de grandes profondeurs et très peu d'informations sont disponibles sur leur écologie et leur comportement (Didier, 2004 ; 2010). Pour la chimère *C. milii*, bien que de récentes études démontrent une plus grande facilité à se procurer des spécimens, il reste que ces spécimens proviennent des côtes de la Nouvelle-Zélande et de l'Australie (Didier, 1995 ; Gillis *et al.*, 2011) et leur récupération et transport demande une logistique et un coût considérables. C'est pourquoi les spécimens utilisés dans cette étude proviennent d'une collection muséale. L'utilisation d'un grand nombre de spécimens de *A. radiata* a été rendue possible grâce à une collaboration avec Pêches et Océans Canada.

Ampleur de l'analyse performée

Aucune autre étude n'a analysé avec autant de détail la progression de la chondrification et de la minéralisation endosquelettiques chez des chondrichthyens. L'analyse complète des nageoires pectorales et pelviennes de *C. milii* représente l'identification de plus de 3000 éléments, la région occipitale et le

synarcuum de *C. milii* de plus de 500 éléments et le squelette entier de *A. radiata* plus de 20 000 éléments. Ces éléments ont été observés, illustrés et analysés afin de comprendre l'ordre d'apparition et la direction de formation du cartilage et de la minéralisation. Ceci a permis une description beaucoup plus détaillée de la progression de la chondrification et de la minéralisation chez des espèces de chondrichthyens comparée aux études précédentes (Benzer, 1944 ; Didier, 1995 ; Eames *et al.*, 2007 ; Johanson *et al.*, 2013), permettant ainsi de décrire pour la première fois des modules morphologiques et développementaux chez les nageoires paires des poissons, de confirmer que les synarcua des chimères et des raies ne sont pas homologues, et d'établir des tendances générales et des conditions plésiomorphes pour les espèces de gnathostomes actuels.

5.1.3 Rappel des objectifs

L'objectif général de cette recherche était de décrire les séquences ontogénétiques de chondrification et de minéralisation chez deux espèces de chondrichthyens, la chimère-éléphant (*C. milii*) et la raie épineuse (*A. radiata*), respectivement. Leur séquences ontogénétiques ont permis l'analyse de la progression endosquettique de ces processus afin de valider la présence de patrons généraux, de modules et la formation de systèmes morphologiques tels le synarcuum et les nageoires paires chez la chimère-éléphant et la caractérisation de la minéralisation et la détermination de patron généraux chez la raie épineuse. Les spécimens utilisés (embryons et juvéniles) ont été doublement colorés et l'ontogénie squelettique décrite.

Objectif 1 - Description de la morphologie et du développement morphologique des nageoires paires chez Callorhinchus milii

La séquence ontogénétique de la progression de la chondrification des nageoires

paires a été décrite et analysée, ce qui permettait de décrire leurs morphologies, l'ordre de mise en place des éléments cartilagineux, ainsi que leurs directions de formation. La morphologie, l'ordre et la direction de mise en place des éléments cartilagineux des nageoires pectorales ont ensuite été comparés à ceux présents chez les nageoires pelviennes afin de vérifier si elles étaient similaires, ce à quoi on s'attendrait dans le cas d'homologues sériés. Une grande similarité (morphologique, développementale) entre les nageoires appuierait la théorie de la duplication, et suggérerait la présence de modules morphologiques et développementaux. Finalement, les ordres et directions de mise en place des éléments endosquelettiques des actinoptérygiens et des chondrichthyens ont été comparés et discutés.

Objectif 2 - Description de la morphologie et du développement morphologique de la région occipitale et du synarcuum chez Callorhinchus milii

Le deuxième objectif visait à décrire la séquence de chondrification de la région occipitale et du synarcuum afin de valider dans un premier temps si les structures et le développement entre ces deux régions étaient similaires, puisque ces régions sont suggérées comme provenant de sclérotomes homologues sériés. Cette information allait ensuite être intégrée à un contexte phylogénétique afin de comparer le nombre de segments vertébraux incorporés dans le chondrocrâne des chondrichthyens pour vérifier la présence de patrons généraux. La séquence de formation du synarcuum de la chimère allait aussi être comparée à celle présente chez les raies afin de vérifier si ces deux structures sont homologues.

Objectif 3 - Description de la progression ontogénétique de la minéralisation (aréolaire, tesserales) de l'endosquelette complet chez Amblyraja radiata

Cet objectif avait pour but de décrire la progression de la minéralisation en

caractérisant les types, les ordres et les directions de minéralisation, et de les comparer à ceux présents chez les autres espèces de chondrichthyens pour vérifier leur similarité et établir des tendances générales aux chondrichthyens. Celles-ci allaient ensuite être comparées aux tendances d'ossification présentes chez les actinoptérygiens pour valider la présence de tendances générales de minéralisation chez les gnathostomes.

5.2 Principaux résultats

5.2.1 Description de la morphologie et du développement morphologique des nageoires paires chez *Callorhinchus milii*

Le premier objectif était d'analyser la séquence complète de l'apparition et la mise en place des éléments endosquelettiques cartilagineux chez les nageoires paires d'un chondrichthyen. Bien que les embryons de chondrichthyens aient été un sujet d'étude depuis plus de deux siècles, des lacunes existaient au niveau de la description du développement des nageoires paires, notamment l'ordre et la mise en place des éléments endosquelettiques. Bien qu'une description générale de la morphologie des nageoires paires de *C. milii* avait déjà été faite précédemment (Didier, 1995), la description détaillée faite au cours de cette étude démontre une organisation plus complexe et un plus grand nombre d'éléments que précédemment décrits, ainsi que l'ordre et la direction de la mise en place des éléments des nageoires pectorales.

Les nageoires paires sont des homologues sériés et des modules morphologiques et développementaux

Notre première hypothèse, que les nageoires pectorales et pelviennes possèdent une morphologie et un développement similaire, a été validée. Cette hypothèse est

en lien direct avec la notion que les nageoires paires sont des homologues sériés. Cette notion d'homologie sériée, bien que mentionnée dans la littérature (Cole et Currie, 2007 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Shubin, Tabin et Carroll, 1997), n'avait jusqu'à présent jamais été validée, et reposait sur le fait que les membres des tétrapodes, qui ont évolué à partir des nageoires paires, sont eux considérés comme homologues sériés à la morphologie et au développement très similaires (Bininda-Emonds *et al.*, 2007 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000 ; Young et Hallgrímsson, 2005), et sur la similarité des expressions géniques observées au cours de la formation des nageoires pectorales et pelviennes (Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Horton *et al.*, 2008). De plus, l'identification de modules développementaux par Mabee *et al.* (2002) chez les nageoires médianes des actinoptérygiens et la description des membres pairs des tétrapodes en tant que modules développementaux et morphologiques de Young et Hallgrímsson (2005) mena à la réflexion à savoir si de tel modules sont présent dans les nageoires paires des poissons.

Les études démontrant la similarité du développement moléculaire entre les nageoires paires des chondrichthyens suggéraient aussi la possibilité de modules chez ce groupe. La similarité dans la morphologie et le développement des nageoires paires de *C. milii* confirme leur état en tant qu'homologues sériés. La très grande similarité morphologique entre les nageoires paires correspond à la définition d'un module morphologique, et la très grande similarité dans l'ordre et la mise en place des éléments endosquelettiques correspond à la définition d'un module développemental (Cloutier *et al.*, 2010 ; Mabee *et al.*, 2002 ; Winther, 2001) ; les nageoires paires de *C. milii* représentent donc des modules morphologiques et développementaux.

Les notions d'homologie sériée et de modularité suggèrent un phénomène de duplication (Hall, 1995b) ; les nageoires pectorales sont apparues en premier et

leurs mécanismes développementaux dupliqués et réitérés postérieurement, résultant en l'origine des nageoires pelviennes (Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000). La très grande similarité entre la structure et le développement morphologique des nageoires paires appuie cette théorie. Puisque les éléments sériés sont le produit de duplication et que les modules sont aussi sujet à être dupliqués (Raff, 1996), notre analyse appuie la théorie de la duplication et répond affirmativement à la question "est-ce que les nageoires pelviennes sont une copie des nageoires pectorales" (Minguillon, Gibson-Brown et Logan, 2009 ; Ruvinsky et Gibson-Brown, 2000).

Malgré cette très grande similarité, il existe des différences morphologiques entre les nageoires paires. Les nageoires pectorales démontrent un plus grand nombre d'éléments endosquelettiques (basaux, radiaux) ainsi que d'éléments qui ne sont pas présents dans les nageoires pelviennes (éléments irréguliers et éléments interdistaux) ; de plus, les éléments interdistaux se développent suivant une direction postéro-antérieur, contrairement au reste des éléments des nageoires paires qui se développent en suivant une direction antéro-postérieure. Ces différences peuvent être expliquées par un déphasage du timing des expressions géniques entre les nageoires paires des chondrichthyens. Le gène *Sox8* est associé à la formation du cartilage, et est exprimé dans les nageoires pectorales de *S. canicula* du stade 27 jusqu'au stade 32 minimalement, tandis qu'il est exprimé du stade 29 au stade 31 dans les nageoires pelviennes (Freitas, Zhang et Cohn, 2007).

La période d'expression de *Sox8* étant plus longue dans les nageoires pectorales pourrait expliquer le nombre d'éléments endosquelettiques plus élevé.

L'expression de *Shh* est aussi différente entre les nageoires pelviennes mâles et femelles, étant maintenue plus longtemps dans la partie postérieure des nageoires des mâles (jusqu'au stade 32), comparativement aux femelles (stade 30). Ceci serait corrélé à la présence de ptérygopodes chez les mâles (Dahn *et al.*, 2007).

Chez les tétrapodes, le facteur de transcription *Pitx* est présent chez les membres postérieurs seulement, et est étroitement lié à l'identité des éléments endosqueletiques ; bien que l'expression de *Pitx* n'est pas caractérisé chez les chondrichthyens, il est possible que ce facteur soit responsable des structures propres aux nageoires pelviennes, tel les ptérygopodes (Dahn *et al.*, 2007).

Développement des nageoires paires des chondrichthyens et description des conditions plésiomorphes

La deuxième hypothèse présentée dans le cadre du premier objectif a aussi été validée, puisque les nageoires paires de *C. milii* se développent de façon similaire à celle des autres chondrichthyens, selon les descriptions provenant de travaux antérieurs (Balfour, 1881 ; Cohn *et al.*, 2002a ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Goodrich, 1906 ; Holmgren, 1933). Chez les nageoires paires des chondrichthyens, les nageoires pectorales se développent avant les nageoires pelviennes, le mésenchyme se divise en éléments distincts avant la chondrification et les basaux se chondrifient avant les radiaux.

Cette étude permet la comparaison des patrons de développement (ordre et direction de la mise en place des éléments cartilagineux) entre les chondrichthyens et les actinoptérygiens. Cette comparaison nous a permis d'établir les patrons de développement communs aux chondrichthyens et aux actinoptérygiens et parce qu'ils sont communs à ces deux groupes, ils sont considérés comme des conditions plésiomorphes des gnathostomes. Ces conditions sont une direction de développement proximo-distale, la présence d'un module chez les nageoires paires et les membres pairs et le développement des nageoires pectorales avant les nageoires pelviennes.

Les séquences ontogénétiques démontrent une condition morphologique et

développementale qui n'est pas observée chez le stade adulte

L'analyse de la progression de la chondrification a aussi révélé deux nouveautés : la fusion de deux masses de cartilage (les processus métaptérygiaux) pour former le métaptérygium (appelé dans cette étude complexe métaptérygial) et l'articulation du proptérygium et du complexe métaptérygial avec le coracoïde chez les jeunes stades de développement (stades 31 et 32). La présence des deux processus métaptérygiaux lors de la formation du métaptérygium dans la nageoire pectorale, et du basiptérygium dans la nageoire pelvienne, amènent à se poser la question si, en fait, le processus antérieur représenterait le mésoptérygium et le processus postérieur le métaptérygium. Ceci signifierait que la réelle condition des nageoires pectorales de *C. milii* serait tribasale, pareil à la condition observée chez les élasmobranches, et que la condition plésiomorphe des espèces de chondrichthyens actuels serait tribasale.

Autre point important, le proptérygium et le complexe métaptérygial s'articulent tous les deux avec le coracoïde de la ceinture pectorale plus tôt au cours du développement, chez les spécimens du stade 31 et le spécimen le plus précoce du stade 32. Chez le spécimen le plus avancé du stade 32, le complexe métaptérygial ne s'articule plus avec le coracoïde, mais seulement avec le proptérygium. La présence de trois éléments basaux s'articulant avec la ceinture pectorale est aussi similaire à la condition observée chez les élasmobranches. Ces deux observations viennent illustrer les problèmes liés à l'utilisation du phénotype adulte (Scholtz, 2005) lors des analyses sur l'évolution morphologique des nageoires paires. Le phénotype adulte des nageoires paires peut résulter de la fusion des éléments et de changements dans leur emplacement au cours de l'ontogénie (Compagno, 1999). Ainsi, la détermination des conditions plésiomorphes et de l'homologie entre les éléments des nageoires des gnathostomes devient beaucoup plus complexe, en plus des problèmes liés à l'utilisation variable des termes monobasal et polybasal,

qui ne reflètent pas l'homologie entre les éléments.

5.2.2 Description de la morphologie et du développement morphologique de la région occipitale et du synarcuum chez *Callorhinchus milii*

Le deuxième objectif était de décrire la formation de la partie occipitale du chondrocrâne et le synarcuum de *C. milii*, car peu d'informations sont disponibles pour les chondrichthyens, ainsi que mentionné par plusieurs études (Bemis et Forey, 2001 ; Britz et Johnson, 2010 ; Claeson et Hilger, 2011 ; Johanson, Carr et Ritchie, 2010 ; Johanson *et al.*, 2013). Ces données ont été utilisées afin de comparer le développement de ces deux régions dites homologues, de comparer la composition de la région occipitale entre les espèces de chondrichthyens et de comparer le développement du synarcuum observé chez *C. milii* à celui décrit pour les raies, ces synarcua étant interprétés comme non-homologues.

Le développement de la région occipitale et de la colonne vertébrale diffère

La première hypothèse que nous avons proposée est en lien direct avec l'étude de Johanson *et al.* (2010). Johanson *et al.* (2010) ont mentionné que la région occipitale et la colonne vertébrale proviennent de somites post-otiques consécutifs, et pouvaient donc être considérées comme régions homologues sériées ; malgré ceci, ces régions n'étaient pas morphologiquement similaires chez l'adulte. La série ontogénétique de *C. milii* nous donnait l'opportunité de vérifier cette question, à savoir si la région occipitale et la partie antérieure de la colonne vertébrale démontraient une morphologie et une mise en place des éléments similaires au cours du développement. Cependant, *C. milii* possède un synarcuum situé immédiatement postérieur à la région occipitale, et donc cette similarité, si présente, ne pourrait être observée que chez les jeunes stades (stades 30-32), avant

le début de la formation du synarcuum.

Notre hypothèse de similarité développementale entre ces deux régions a été réfutée, car aucun élément vertébral (basidorsaux, basiventraux, arcs neuraux) n'a été observée dans la région occipitale pendant les stades 30-32, tandis que des basidorsaux et des arcs neuraux apparaissent sur la surface dorsale de la notochorde dans la région du synarcuum pendant le stade 31, ainsi que la formation des sections latérales ventrales du synarcuum. La base de la section occipitale de *C. milli* est formée par les parachordaux, et la progression de la chondrification procède ventro-dorsalement, en délimitant les foramina des nerfs crâniens. Cependant, bien que la présence de basidorsaux n'a pu être confirmée, des protubérances cartilagineuses, à la teinte plus foncée, semblaient être présentes sur la surface latéro-dorsale de spécimens du stade 31 (ANSP174661) et stade 32 (ANSP174696). Ainsi, le développement de ces régions, provenant de sclérotomes considérées homologues, diffère chez *C. milii*, corroborant ainsi Johanson *et al.* (2010).

La structure de la région occipitale des chondrichthyens est variable

La deuxième hypothèse, que la composition de la région occipitale sera similaire entre les différentes espèces de chondrichthyens, est en lien direct avec l'étude par Bemis et Forey (2001) et Britz et Johnson (2010). Bemis et Forey (2001) ont performé un inventaire des éléments incorporés dans la région occipitale du crâne chez les chondrichthyens, les actinoptérygiens et les sarcoptérygiens dans un cadre phylogénétique. Ils décrivent la composition de la région occipitale chez plusieurs ordres d'actinoptérygiens, mais utilisèrent la condition observée chez seulement deux espèces de requins, *S. acanthias* et une espèce non-identifiée du genre *Etmopterus*, afin de reconstituer la condition générale des chondrichthyens. Britz et Johnson (2010) suggérèrent que la région occipitale des chondrichthyens

est homologue entre les différentes espèces, malgré l'absence de données à ce sujet. Ces deux études ont mené à la question à savoir si toutes les espèces de chondrichthyens possédaient une composition occipitale similaire, spécialement entre les holocéphales et les élasmobranches puisque leur séparation phylogénétique remonte à minimum 318 millions d'années (Grogan et Lund, 2004), voire 400 millions d'années (Coates et Sequeira, 2001b ; Inoue *et al.*, 2010 ; Renz, Meyer et Kuraku, 2013).

Nous avons procédé en deux étapes afin de caractériser la disparité relative à la morphologie de la région occipitale des chondrichthyens ; dans un premier temps, nous avons comparé la composition de la région occipitale de *C. milii* à celle décrite pour les autres espèces de chondrichthyens dans des études précédentes, puis nous avons compté le nombre de foramina de nerfs spino-occipitaux présents chez les chondrocrânes des chondrichthyens afin de vérifier si des patrons évolutifs étaient présents. L'absence de basiventraux et basidorsaux distincts chez *C. milii* est similaire à ce qui avait été observé par El-Toubi (1949) et Jollie (1971) chez *S. acanthias*, mais différent des observations faites par de Beer (1937) et Holmgren (1940) chez d'autres espèces de requins et de raies, où plusieurs éléments vertébraux semblent avoir été incorporés à la région occipitale.

Nous avons aussi utilisés le nombre de foramina observés dans la partie occipitale et dans le synarcuum à titre indicatif du nombre de segments vertébraux incorporés, et avons démontré qu'une grande variation dans le nombre de foramina est présente entre les espèces de requins, de raies et de chimères. Chez les requins du groupe des Galeomorphii, le nombre de foramina est plus conservateur comparativement aux Squalomorphii. Il est important de mentionner que cette disparité est vraisemblablement due à peu d'information disponible pour le groupe des Galeomorphii, et à la différence entre le nombre rapporté d'une étude à l'autre pour *S. acanthias*. Les raies possèdent peu de foramina dans leur

région occipitale qui est courte. Chez les chimères, le nombre de foramina présents chez la famille considérée la plus basale (Callorhinchidae) est plus élevée. Cette comparaison ne permet pas d'établir la condition plésiomorphe des chondrichthyens actuels, mais démontre les lacunes présentes.

Le synarcuum de la chimère n'est pas homologue à celui des raies

Un synarcuum constitué par la fusion des premiers éléments vertébraux est présent chez les raies (Compagno, 1977) et les chimères (Didier, 1995) actuelles. Ces synarcua sont considérés comme structures non-homologues basé sur leur morphologie (Maisey, 1986 ; Patterson, 1965), ou à l'homologie incertaine (Aschliman, Claeson et McEachran, 2012 ; Claeson, 2011). Johanson *et al.* (2013) considèrent ces synarcua non-homologues, et utilisèrent un nombre inconnu de spécimens de raies et de chimères (et non une série ontogénétique) pour décrire la formation des synarcua. Cependant, le critère ontogénétique d'homologie n'a jamais été validé relativement à la formation du synarcual chez les raies et les chimères. Le critère ontogénétique est un facteur important afin de définir ce qui constitue une homologie (Ereshefsky, 2010 ; Rieppel, 2005), et l'ontogénie de ces synarcua n'a pas été comparées puisque la progression de la chondrification du synarcua de *C. milli* n'a pas été décrite.

De plus, ce critère ontogénétique est aussi considéré important afin de mieux comprendre la diversification des chondrichthyens (Claeson, 2011). Les éléments endosquelettiques et la formation du synarcuum de *C. milii* ont été décrits et comparés à ceux mentionnés chez les raies (Miyake, 1988). Bien que certains éléments vertébraux (basidorsaux et arcs neuraux) sont incorporés dans les synarcua des chimères et des raies, la formation des foramina des nerfs spinaux diffère entre les deux taxa, ainsi que l'identité de plusieurs éléments propres à chacun des groupes. De plus, l'homologie entre les basidorsaux et basiventrals

des chimères et ceux des élasmobranches est contestée, due à leur positions différentes le long de la notochorde (Johanson *et al.*, 2013). Cependant, il est intéressant de noter que la position des basiventraux de raies démontre aussi de la variation entre différentes espèces (Miyake, 1988), sans pour autant que leur homologie soit remise en cause (Johanson *et al.*, 2013). Ainsi, l'hypothèse de non-homologie entre les synarcua des raies et des chimères est validée basée sur l'identité des éléments endosquelettiques et leur fusion au cours du développement, et non basée sur leur phénotype adulte.

5.2.3 Description de la progression ontogénétique de la minéralisation (aréolaire, tesserale) de l'endosquelette complet chez *Amblyraja radiata*

Cet objectif avait pour but de caractériser le type, l'ordre, la direction et le patron de distribution de la minéralisation chez un chondrichthyen afin de vérifier si ceux-ci étaient similaires entre espèces de chondrichthyens. L'ordre et la direction de minéralisation ont ensuite été comparées entre les chondrichthyens et les actinoptérygiens afin de vérifier si des tendances générales dans la minéralisation des gnathostomes actuels pouvaient être décrites.

Le type, l'ordre, la direction et le patron de distribution de la minéralisation sont similaires chez les chondrichthyens

La première hypothèse, que les caractéristiques de la minéralisation (tesserale et aréolaire) seront similaires entre différentes espèces de chondrichthyens, est en lien avec l'article de Mabee *et al.* (2002) décrivant les directions de développement (chondrification, ossification) des nageoires médianes chez les différents groupes d'actinoptérygiens. Bien que plusieurs directions sont observées, les nageoires médianes démontrent une direction de développement

conservée chez une majorité d'espèces, ce que Mabee *et al.* (2002) interprétèrent comme une présence de modules développementaux. Ils déplorèrent le manque d'information au niveau des chondrichthyens, ce qui empêchait l'établissement de conditions plésiomorphes chez les gnathostomes actuels. Afin de pallier à cette lacune, le type de minéralisation, l'ordre dans lequel les éléments endosquelettiques se minéralisent, la direction de la progression de minéralisation et les patrons de distribution des tesserae sur les éléments endosquelettiques de *A. radiata* ont été comparés à ceux décrits pour différentes espèces de chondrichthyens (Benzer, 1944 ; Claeson, 2011 ; Eames *et al.*, 2007 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Johanson *et al.*, 2013 ; Schaefer et Summers, 2005 ; Summers, Ketcham et Rowe, 2004).

Le type de minéralisation et sa localisation étaient similaires chez tous les chondrichthyens, avec la minéralisation aréolaire présente dans les centra des élasmobranches, et la minéralisation tesserale sur les autres éléments endosquelettiques (Kemp et Westrin, 1979). Chez les raies, les patrons de distribution de la minéralisation étaient similaires entre les synarcuum de *A. radiata* et cinq espèces actuelles (*Okamejei kenojei*, *Amblyraja radiata*, *Leucoraja erinacea*, *Leucoraja naevus* and *Malacoraja senta*) dont la minéralisation a été décrite par Claeson (2011). Cependant, les directions étaient différentes. Les raisons pour ces différences sont difficiles à identifier, car toutes les espèces sont de la même famille (Rajidae), et *A. radiata* figurait parmi les espèces étudiées par Claeson (2011). Une différence dans le procédé de coloration, dans l'état (stade, longueur, provenance) ou le nombre de spécimens pourrait être à l'origine de celle-ci.

Schaefer et Summers (2005) remarquèrent que différents patrons de distribution étaient présents sur les radiaux des nageoires pectorales chez différentes familles

de raies, et que ceux-ci étaient associés à leur mode de nage (oscillatoire, ondulatoire). Le patron de distribution observé chez les radiaux de *A. radiata* correspondait à celui observé chez les Rajidae.

Cependant, les patrons de distribution de tesserae n'étaient pas toujours faciles à catégoriser, et certains semblaient représenter des états intermédiaires ; c'est peut-être la raison pour laquelle Schaefer et Summers (2004) suggérèrent qu'un patron de distribution caténée, soit la distribution de tesserae en chaînes le long d'éléments endosquelettiques (et celle observée chez les nageoires paires de *A. radiata*) représentait le précurseur ontogénétique de la distribution crustale, qui est le recouvrement complet d'un élément endosquelettique par des tessères. Ceci n'a pu être validé chez *A. radiata*, car la minéralisation chez un spécimen adulte n'a pas été performée. Une autre hypothèse de Schaefer et Summers (2004) était que la progression de la minéralisation suit une direction proximo-distale, puisque les jeunes stades qu'ils ont observés démontraient de la minéralisation seulement sur les radiaux proximaux. Cette hypothèse a été confirmée chez *A. radiata*, chez qui la minéralisation des nageoires paires suit une direction proximo-distale.

L'ordre de minéralisation observé chez *A. radiata* semble généralement similaire à ceux observés chez les autres chondrichthyens, excepté pour la minéralisation comparativement hâtive des arcs branchiaux chez *S. acanthias* (Benzer, 1944) et des mâchoires chez *S. acanthias* observé par Yucha (1998). En général, les centra se minéralisent en premier chez les requins, similairement à ce qui a été observé chez *A. radiata*. Les directions de minéralisation inférées des études de Summers *et al.* (2004) sur *H. francisci*, de Eames *et al.* (2007) sur *C. ventriosum*, soit une direction postéro-antérieure pour le chondrocrâne et bidirectionnelle pour la colonne vertébrale sont similaires à celles observées chez la *A. radiata*. Pour ce qui est des patrons de distribution des tessères, les requins ont tous un patron crustal (Schaefer et Summers, 2005).

Les contraintes phylogénétiques sont difficiles à décrire puisqu'une seule autre étude, celle de Mabee *et al.* (2002), regarde les directions de minéralisation présentes chez les poissons. Il est intéressant de noter que l'ordre et les directions de minéralisation sont similaires entre les espèces vivipares (*S. acanthias*, *C. fabricii*, *T. torpedo*, *D. americana*, *R. lentiginosus*) et ovipares (*C. ventriosum*, *H. franscisi*, *A. radiata*, *M. senta*, *R. texana*), même si l'environnement dans lequel les embryons se développent est différent (oothèque vs utérus de la femelle). Cette similarité pourrait provenir d'une contrainte phylogénétique, mais les données sont trop limitées pour confirmer ceci.

Ces patrons de minéralisation similaires pourraient aussi être la conséquence de contraintes mécaniques semblables. La minéralisation chez les chondrichthyens est induite par des stress mécaniques produit par les mouvements (Dingerkus, Séret et Guilbert, 1991 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Summers, 2000). Les premiers éléments à se minéraliser chez les embryons d'espèces ovipares sont les centra et éléments vertébraux ; ceci est conforme au mouvement observé chez les embryons à l'intérieur de l'oothèque, qui vont onduler leur queue afin d'augmenter la circulation d'eau nouvelle et oxygénée à l'intérieur de l'oothèque (Kempster, Hart et Collin, 2013 ; Leonard, Summers et Koob, 1999 ; Luer *et al.*, 2007 ; Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008 ; Mellinger, Wriese et Alluchon-Gerard, 1986 ; Rodda et Seymour, 2008 ; Wyffels, 2009).

Nos résultats démontrent aussi que le nombre d'éléments minéralisés est beaucoup plus élevé chez les spécimens juvéniles que chez les embryons. Ceci est conforme aussi à ce qu'une plus grande mobilité – la nage active – performée par les juvéniles, représente une contrainte fonctionnelle plus élevée sur l'endosquelette, qui elle génère une augmentation de la minéralisation des éléments endosquelettiques. Une différence entre les patrons de distribution de

minéralisation liée au mode de nage a aussi été observée par Schaefer et Summers (2005) sur les nageoires pectorales des raies. Ainsi, la nage (ou la contrainte fonctionnel engendré par celle-ci) pourrait aussi expliquer les différences dans le patron de distribution des tessères entre les lobes antérieurs et postérieurs des nageoires pelviennes chez *A. radiata*. En effet, les membres de la famille des Rajidae, incluant *A. radiata*, sont reconnus pour se déplacer sur les fonds marins en avançant, à tour de rôle, leurs nageoires pelviennes ; le lobe antérieur de la nageoire est propulsé vers l'avant, tandis que le lobe postérieur n'est impliqué dans aucun mouvement actif (Holst et Bone, 1993 ; Koester et Spirito, 2003b ; Lucifora et Vassallo, 2002 ; Macesic et Kajiura, 2010). Le premier et second radiaux du lobe antérieur étaient couverts d'un patron crustal, tandis que le reste des radiaux démontrait des tesserae seulement sur leurs surfaces antérieure et postérieure. Ceci est différent des patrons observés sur le lobe postérieur de la nageoire, où les tesserae étaient moins nombreuses et distribués sur les surfaces dorsale et ventrale seulement. Ces différences sont probablement liées à la différence des contraintes mécaniques placées sur les deux lobes. Finalement, Yucha (1998) avait aussi suggéré que la présence de minéralisation sur les mâchoires d'un embryon de *S. acanthias* était liée au mouvement de celles-ci ; un stress mécanique pourrait aussi être à l'origine de la minéralisation hâtive observée par Summers *et al.* (2004) sur les mâchoires d'un embryon de *H. francisci*, puisqu'une ventilation active oro-pharyngienne est observée lorsqu'il n'y plus assez de place dans l'oothèque pour bouger la queue.

Ainsi, notre hypothèse de similitude dans les caractéristiques de minéralisation chez les chondrichthyens est supportée en général, malgré la présence de variabilité au niveau du synarcuum et des arcs branchiaux. Ces résultats peuvent représenter des conditions plésiomorphes pour les chondrichthyens actuels, quoique les contraintes phylogénétiques et mécaniques n'ont pas été vérifiées. Si les conditions observées chez les chondrichthyens sont comparées à celles des

actinoptérygiens actuels, et des ordres et directions d'ossification similaires observées, ceux-ci pourront être suggérées comme plésiomorphes chez les espèces actuelles. Cependant, ces conditions pourraient, elles aussi, être due à des contraintes mécaniques plutôt que phylogénétiques, mais le manque d'information nous empêche de vérifier ceci.

Ordre et directions de minéralisation similaires entre chondrichthyens et actinoptérygiens

La deuxième hypothèse est liée à la section précédente, afin de vérifier si des tendances générales dans l'ordre et la direction de l'ossification/minéralisation des espèces actuelles d'actinoptérygiens et des chondrichthyens pouvaient être établies. L'étude de Mabee *et al.* (2002) décrivait les directions de développement seulement pour les nageoires médianes des actinoptérygiens ; les ordres et directions d'ossification ont été compilées pour le restant de leur squelette. Bien qu'il existe une grande variabilité dans celles-ci, le neurocrâne, la colonne vertébrale et la nageoire caudale sont les systèmes morphologiques qui s'ossifient en premier, et les nageoires paires s'ossifient suivant une direction proximo-distale.

Notre hypothèse s'avère donc fausse, et la présence d'un ordre de minéralisation et d'une direction de minéralisation similaire entre ces deux groupes peut être expliqué. La minéralisation tesserale et l'ossification sont des processus différents, utilisés afin de renforcer l'endosquelette ; cependant, la composante génétique de la minéralisation chez les chondrichthyens, ainsi qu'analysée chez *C. milii*, possède les mêmes gènes que ceux présents chez les actinoptérygiens, à l'exception d'une seule famille de gènes, les gènes SCPP (Ryll *et al.*, 2014 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Donc, ces processus peuvent être quand même comparés, surtout qu'un lien existe entre le stress mécanique et l'ossification chez les

actinoptérygiens (Fiaz *et al.*, 2012 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012) et la formation de tesserae chez les chondrichthyens (Dingerkus, Séret et Guilbert, 1991 ; Grogan et Yucha, 1999 ; Summers, 2000). Les premiers stress mécaniques infligés au squelette au cours du développement d'un poisson sont générés par le mouvement des mâchoires afin de se nourrir et respirer, des arcs branchiaux pour respirer et de la colonne vertébrale pour se déplacer, ce qui favorise la minéralisation des éléments associés à ces fonctions (Cubbage and Mabee, 1996 ; Fiaz *et al.*, 2012 ; Yucha, 1998). Ceci est en accord avec l'ordre et le patron d'ossification ou de minéralisation observés comme tendances générales. Ainsi, une contrainte mécanique pourrait expliquer ces tendances.

5.3 Portée de l'étude

L'ensemble des chapitres de cette étude représente une des études les plus détaillées de la progression de la chondrification et de la minéralisation chez des chondrichthyens. Il est à noter que les études de Grogan *et al.* (1999) et Gillis *et al.* (2009) sur la progression de la chondrification et celles de Yucha (1998), Eames *et al.* (2007) et Claeson (2011) sur la progression de la minéralisation sont aussi importantes, bien que moins exhaustives que la présente. Seule l'étude de Grogan *et al.* (1999) décrit la progression de la chondrification chez *C. milii* et se concentre sur la formation du chondrocrâne ; la présente étude est la seule à décrire la progression de la chondrification dans la région post-crânienne chez un holocéphale. Seulement deux autres études portent sur la minéralisation du squelette des raies : Claeson (2011) décrit la progression de la minéralisation du synarcuum, et Schaefer et Summers (2005) celle des nageoires pectorales.

Deux autres études portent sur la progression de la minéralisation de l'endosquelette des requins (Benzer, 1944 ; Eames *et al.*, 2007) ; cependant, leur description de cette progression demeure générale. Ainsi, ceci constitue la

première étude décrivant en détail le progrès de minéralisation sur l'endosquelette complet d'un élasmobranche. Bien que l'objectif général de cette thèse soit descriptif, les données obtenues ont contribué significativement à répondre à des questions sur l'évolution des gnathostomes, concernant l'apparition des nageoires pelviennes, la régionalisation de l'axe vertébral et les processus de minéralisation du squelette.

La grande majorité des études mentionnant les nageoires paires comme homologues sériés portent, en fait, sur l'évolution de la morphologie des membres des tétrapodes (Bininda-Emonds *et al.*, 2007 ; Shubin, Tabin et Carroll, 1997). Cette notion d'homologie des nageoires paires a surtout été considérée comme un fait accompli, supporté par les nombreuses études moléculaires démontrant les similarités d'expressions géniques entre les nageoires paires (Wagner, 2014). Fait intéressant, bien que ces études moléculaires aient utilisé les nageoires paires des chondrichthyens (Dahn *et al.*, 2007 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2006 ; Freitas, Zhang et Cohn, 2007 ; Gillis *et al.*, 2011), aucune étude sur leur morphologie n'est venu corroborer ce fait, la morphologie de leurs nageoires paires étant jugée trop différentes (Wagner et Larsson, 2007).

L'utilisation d'une série développementale morphologique provenant d'une espèce de chondrichthyen pour valider la notion d'homologie sériée entre nageoires paires est donc cohérente avec les études moléculaires. Cette étude a aussi suggéré la présence de modules (morphologiques, développementaux) des nageoires paires ainsi qu'observés au niveau des membres pairs des tétrapodes (Young et Hallgrímsson, 2005). Ceci apporte des preuves morphologiques, qui, en complément des études moléculaires, apportent un appui majeur à la théorie de l'origine des nageoires pelviennes par un processus de duplication des nageoires pectorales.

Récemment, des études se sont intéressées à la partie occipitale du chondrocrâne des gnathostomes (Bemis et Forey, 2001 ; Britz et Johnson, 2010 ; Johanson, Carr et Ritchie, 2010), et ont déploré le manque d'informations ontogénétiques disponibles pour les chondrichthyens, et suggérèrent que des études ontogénétiques devraient être entreprises chez ce groupe. Ceci constitue la première étude décrivant en détail la formation de la région occipitale du chondrocrâne chez la chimère. Bien qu'aucun élément vertébral ne semble avoir été incorporé dans la région occipitale, de légères protubérances ont été observées sur la surface dorsale de la notochorde et la possibilité que celles-ci représentent des basidorsaux restera à confirmer dans le futur, surtout que Johanson *et al.* (2015) aient démontré la présence d'éléments vertébraux en phase pré-cartilagineuse dans cette région.

Johanson *et al.* (2010) mentionnèrent que, malgré le fait qu'elles provenaient de somites consécutives considérées comme homologues, la région occipitale et le synarcuum des chondrichthyens n'étaient pas similaires. Cependant, cet énoncé de non-similarité était basé sur l'information limitée présentée par Bemis et Forey (2001). De plus, il était quand même possible que ces deux régions se ressemblent avant la formation du synarcuum ; cette étude est la première à comparer la mise en place des éléments cartilagineux dans chacune de ces régions, et confirme ainsi l'énoncé de Johanson *et al.* (2010).

Afin de palier à la paucité d'information mentionnée sur ces deux régions, nous avons compilés depuis la littérature, le nombre de foramina présent dans la partie occipitale des chondrichthyens, proxy aussi utilisé par Bemis et Forey (2001) mais décrié par Britz et Johnson (2010) et le nombre de foramina présent chez les synarcuum de raies. Bien qu'utilisé seulement à titre indicatif, le nombre de foramina est souvent la seule information disponible présente dans la littérature. Ceci représente la première compilation de l'information des régions occipitales et

post-occipitales chez les chondrichthyens, placée dans un contexte phylogénétique afin de mieux comprendre leur patron évolutif. Finalement, cette étude a permis de clarifier que le synarcua de raie n'est pas homologue à celui de la chimère basé sur des preuves ontogénétiques.

Peu d'études ont caractérisé les tesserae ainsi que leur formation (Dean, Chiou et Summers, 2005 ; Dean et Summers, 2006 ; Kemp et Westrin, 1979 ; Ørvig, 1951) en utilisant différents stades ontogénétiques (Dean *et al.*, 2009 ; Summers, Ketcham et Rowe, 2004 ; Yucha, 1998). Cependant, les études décrivant la progression de la minéralisation chez les chondrichthyens concernent des systèmes morphologiques spécifiques, tel le synarcuum (Claeson, 2011) et les nageoires paires (Schaefer et Summers, 2005), ou généraux (Benzer, 1944 ; Eames *et al.*, 2007).

Pour la première fois, la progression de la minéralisation a été caractérisée en détail pour l'endosquelette complet d'un chondrichthyen. Ceci a permis, pour la première fois, d'établir ou de confirmer des tendances générales dans la progression de minéralisation chez les chondrichthyens et les actinoptérygiens, ce qui a mis en évidence l'importance des contraintes mécaniques dans les processus d'ossification des actinoptérygiens et de la minéralisation chez les chondrichthyens.

Cette étude permet donc de mieux comprendre comment des informations prises à partir d'espèces actuelles de chondrichthyens permettent de mieux comprendre l'évolution de la squelettogénèse chez les gnathostomes actuels.

5.4 Limitations de l'étude

5.4.1 Conditions inférées à partir d'un nombre d'espèces limitées

Depuis quelques années, il existe une tendance en biologie évolutive du développement, surtout au niveau des études moléculaires, de choisir une espèce de chondrichthyen actuelle et de l'utiliser afin d'inférer des conditions plésiomorphes (Coolen, Menuet et Mazan, 2009 ; Coolen *et al.*, 2007 ; Venkatesh *et al.*, 2007). Un excellent exemple est *C. milii*, utilisée dans notre étude. Les études moléculaires démontrent que *C. milii* semble posséder davantage de gènes dits ancestraux et un taux d'évolution plus lent comparativement aux autres vertébrés (Renz, Meyer et Kuraku, 2013 ; Venkatesh *et al.*, 2014). Cependant, cela n'implique pas nécessairement que les conditions observées chez *C. milii* sont ancestrales, mais simplement qu'il y a plus de chance que leur condition soit moins dérivée que celle observée chez une espèce au taux d'évolution plus rapide, comme par exemple le poisson téléostéen *Danio rerio* (Coates, 2003 ; Ravi et Venkatesh, 2008). Les conditions observées chez *C. milii* pourraient, en fait, être dérivées comparativement aux autres chondrichthyens, ainsi qu'observé pour la condition operculaire des chimères. Celle-ci a été suggérée comme représentant la condition plésiomorphe, alors qu'en fait elle est dérivée comparée aux arcs branchiaux des élasmobranches (Gillis *et al.*, 2011).

Idéalement, les conditions présentes chez les espèces fossiles devraient aussi être intégrées dans les arbres phylogénétiques afin d'établir une condition ancestrale propre aux chondrichthyens; cependant, deux problèmes sont liés à cette démarche. Premièrement, les relations phylogénétiques entre les chondrichthyens actuels et fossiles sont non-résolues, rendant complexe l'identification de taxa basaux (Grogan et Lund, 2004 ; Pradel, Tafforeau et Janvier, 2010). De plus, la détermination de la progression de la chondrification et de la minéralisation des

espèces fossiles nécessiteraient l'utilisation de séries de taille (équivalentes aux séries de croissance chez les espèces actuelles) ; jusqu'à présent, aucune série adéquate n'a pu être reconstituée pour les chondrichthyens, due entre-autre à la fragilité du squelette des jeunes spécimens et leur problème de fossilisation (Cloutier, 2010). Le deuxième problème est qu'il est difficile d'inférer des conditions générales à partir de données sur une seule espèce, car ces conditions pourraient être spécifiques à celle-ci.

Nous avons pallié à ces deux problèmes en comparant les données obtenues pour *C. milii* et *A. radiata* à d'autres espèces. Nous avons compilé l'information disponible relatant la progression de la chondrification et de la minéralisation chez un maximum d'espèces de chondrichthyens. Dans l'ensemble, ces progressions n'étaient pas stipulées et ont été inférées à partir de l'analyse des résultats provenant des différentes études publiées. Nous avons aussi coloré et analysé la minéralisation chez une autre espèce de raie du St-Laurent, la raie lisse (*Malacoraja senta*) et d'un requin, l'aiguillat noir (*Centroscyllium fabricii*). Ces résultats préliminaires ont démontré que le type, l'ordre, les directions de progression et les patrons de distribution de minéralisation étaient similaires à ceux observés chez *A. radiata*. Ces comparaisons ont servi à mieux comprendre si les progressions de chondrification et de minéralisation étaient similaires entre espèces de chondrichthyens actuels, et à quel point les conditions observées sur nos deux espèces étaient communes à l'ensemble des chondrichthyens actuels.

5.4.2 Problèmes liés à la condition et au nombre de spécimens

Les spécimens de *C. milii* analysés au cours de cette étude proviennent d'une collection muséale (Académie des Sciences Naturelles de l'Université Drexel,

Philadelphie, É.-U.) étant donné que les spécimens de chimères sont très difficile à obtenir. Ces spécimens ont été colorés il y a plus de dix ans, et certains sont endommagés. La qualité de la coloration du cartilage entre les spécimens n'était pas constante ; certains spécimens démontraient une coloration très pâle ou diffuse, ce qui rendait l'identification des éléments difficile. Ainsi, notre analyse des éléments endosquelettiques et la progression de chondrification sont intimement liées à la condition de ces spécimens. Ceci dit, la majorité de ces spécimens sont considérés comme démontrant un très bon état de préservation. Une des raisons qui pourrait expliquer les différences dans le degré de coloration entre les spécimens est qu'il se peut que la coloration performée originalement n'était pas optimale, car selon le protocole utilisé, l'intensité de la coloration peut varier. De plus, l'exposition à la lumière des spécimens peut aussi jouer un rôle ; en effet, les spécimens colorés exposés aux rayons UV vont avoir une tendance à devenir plus pâles (R. Cloutier, comm. pers.). Cependant, certaines évidences portent à croire que cette décoloration n'a pas affecté de façon critique les spécimens de *C. milli* utilisés, puisque ceux-ci sont gardés au musée dans des conditions très sombres. De plus, la condition actuelle de certains spécimens (ANSP 174656, 174665, 174696, 174688) semble identique à celle présentes il y a 15 ans, ainsi qu'observé dans l'étude de Grogan *et al.* (1999).

Une autre difficulté liée au protocole de coloration utilisée dans notre étude (Dingerkus et Uhler, 1977) est la décalcification de jeunes spécimens par la solution acide du bleue Alcian (Redfern, Wise et Spence, 2007). Ce protocole a été utilisé afin de colorer les chimères, et pourrait être une raison expliquant l'absence de minéralisation chez *C. milii* ; cependant une différence entre la texture des tissus cartilagineux et minéralisés auraient quand même été observée, ce qui n'est pas le cas. Pour ce qui est de la coloration des spécimens de *A. radiata* la méthode de Dingerkus et Uhler (1977) a quand même été utilisée, et ce, à cause de la très grande qualité et netteté des résultats, comparé à celle résultant

du protocole ‘‘acid free’’ de Redfern *et al.* (2007). Nous avons traité tous les spécimens de *A. radiata* suivant le même protocole et les mêmes procédures, afin de standardiser les résultats. De plus, à titre comparatif, nous avons aussi colorés une autre espèce du St-Laurent, la raie lisse (*Malacoraja senta*), en utilisant le même protocole ; les résultats étaient similaires à ceux obtenus pour *A. radiata*.

Bien que le nombre de spécimens analysés au cours de cette étude dépasse celui utilisé au cours des études précédentes (dans le contexte de progression de la chondrification et de la minéralisation chez un chondrichthyen), il est nettement inférieur à celui observé chez le même genre d’étude performée chez les actinoptérygiens (Cubbage et Mabee, 1996 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012). La raison expliquant cette différence dans le cas de *C. milii* concerne la difficulté d’accès aux spécimens, et pour *A. radiata*, l’ampleur de l’analyse performée sur chaque spécimen.

5.4.3 Problèmes liés à l’utilisation d’un proxy de maturité

L’utilisation d’un proxy afin d’établir une séquence ontogénétique comporte des problèmes spécifiques au proxy utilisé ; les stades de développement démontrent une variation dans le degré de maturité inter-individuelle (Werneburg, 2009) tandis que les proxys de taille peuvent varier de façon intra-individuelle (Adriaens et Verraes, 2002) ; chez les actinoptérygiens, la longueur (totale ou standard) des spécimens est généralement plus étroitement corrélée au stade de développement du squelette (Crotwell et Mabee, 2007) et le nombre de jour après fertilization ou éclosion offre une échelle temporelle (Cloutier *et al.*, 2011).

Chez les chondrichthyens, des stades de développement standardisés sont traditionnellement utilisés pour les embryons (Ballard, Mellinger et Lechenault,

1993 ; Didier, Leclair et Vanbuskirk, 1998 ; Maxwell, Fröbisch et Heppleston, 2008), quoique certaines études organisent les spécimens (embryons et juvéniles) en ordre croissant de longueur (Eames *et al.*, 2007) afin d'établir une série de croissance. Idéalement, la méthode LS_{50} devrait être utilisée pour établir celle-ci afin de minimiser la variation développementale. Cette méthode consiste à établir une régression logistique afin de déterminer à quelle longueur 50% des spécimens possèdent une structure donnée, et ces longueurs sont utilisées afin d'ordonner les spécimens (Fischer-Rousseau, Cloutier et Zelditch, 2009 ; Grünbaum, Cloutier et Vincent, 2012). Cependant, l'utilisation de cette méthode demande un grand nombre de spécimens pour de meilleurs résultats, ce qui n'était pas possible pour la présente étude. Les spécimens de *C. milii* avait déjà été assignés à des stades développementaux, et si une variation était observée à l'intérieur d'un même stade, elle était mentionnée. Les spécimens de *A. radiata* comportaient à la fois des juvéniles et des embryons qui avaient terminé leur chondrification. Afin d'évaluer le meilleur proxy pour les ordonner en séries de croissance, le nombre d'événements de minéralisation par spécimen a été corrélé avec la longueur totale et la largeur du spécimen. La largeur du spécimen était le meilleur proxy pour ordonner les spécimens, ainsi que mentionné par Dean *et al.* (2009), et cette méthode a été utilisée pour les juvéniles et les embryons (plutôt que les stades développementaux) afin de standardiser les résultats.

5.5 Perspectives

5.5.1 La minéralisation chez les espèces actuelles et fossiles de chondrichthyens

Cette étude a démontré l'utilité des informations sur la progression de la chondrification et de la minéralisation provenant d'une série ontogénétique de deux espèces de chondrichthyens (*C. milii*, *A. radiata*). Cette étude a aussi mis en évidence le peu d'information disponible sur les types de minéralisation présents chez les chondrichthyens. Bien que la majorité des études n'identifie que deux types de minéralisation (tesserale, aréolaire), il semble exister au moins un autre type, dit "continu", présent chez les chimères, sur lequel il n'existe aucune information. La minéralisation tesserale est le type qui a reçu le plus d'attention jusqu'à présent, et malgré ceci, son ontogénie et sa trajectoire évolutive (entre autre) restent inconnues. Finalement, la majorité des études concernant la composition et la formation de la minéralisation aréolaire datent du début du vingtième siècle. Puisque les chondrichthyens occupent une place importante dans la polarisation des caractères et la compréhension de leur trajectoire évolutive, ce manque de connaissance au sujet d'un processus aussi important que la minéralisation de leur endosquelette est non seulement surprenante mais aussi indésirable.

Les espèces fossiles d'élastomobranthes démontrent aussi une minéralisation tesserale et aréolaire, mais peu d'études se sont penchées sur leur caractérisation ; de plus, il semble avoir d'autres patrons de minéralisation chez les espèces fossiles qui ne sont pas observés chez les espèces actuelles (Lund et Grogan, 1997a, b ; Maisey, 2013). Aussi, la minéralisation globulaire, présente à l'intérieur des tesserae, est aussi présente chez d'autres groupes de vertébrés fossiles (Ørvig, 1951). Il est donc fort possible que les tesserae soient le résultat d'interactions entre la minéralisation globulaire (plus ancienne phylogénétiquement) et une

minéralisation formé par le périchondre fibreux, qui elle est plus récente (Yucha, 1998).

La minéralisation chez les espèces de chimères actuelles semble réduite comparativement aux autres chondrichthyens et aux espèces de chimères fossiles, qui démontrent un endosquelette fortement minéralisé (Lund, 1977 ; Lund et Grogan, 1997a ; Stahl, 1967). Cependant, il est incertain si le type de minéralisation observé chez les espèces de chimères actuelles est le même que celui observé chez les espèces de chimères fossiles. La comparaison entre les types de minéralisation (tesserale, aréolaire) présents chez les élasmobranches et ceux présents chez les chimères est d'autant plus intéressante car ces deux groupes sont séparés depuis plus de 300 millions d'années (Grogan et Lund, 2004 ; Pradel *et al.*, 2011). De plus, la seule étude concernant la minéralisation chez les chondrichthyens fossiles (Maisey, 2013) se concentre sur la minéralisation tesserale, synapomorphie des chondrichthyens, même si elle ne semble pas être présente chez les espèces d'holocéphales actuelles.

5.5.2 Avenues de recherche sur la minéralisation des chondrichthyens

Cette étude a apporté plusieurs nouvelles informations sur le développement de l'endosquelette de deux espèces de chondrichthyen actuels ; il est cependant nécessaires d'élargir les connaissances sur les différentes types de minéralisations sur d'autres espèces actuelles mais aussi fossiles afin de mieux comprendre l'évolution de ces types. Les futures avenues de recherches qui seraient pertinentes à étudier incluent : 1) la caractérisation morphologique de tous les types de minéralisation présents chez les espèces de chondrichthyens (actuelles et fossiles), 2) les transformations évolutives de ces types à travers le temps, en incluant des espèces fossiles (chondrichthyens et groupes externes), 3) la comparaison de la

morphologie et de la quantité de minéralisation présente pour un ensemble d'espèces provenant d'environnements différents (ex. eau profonde) ou ayant des comportements différents. Certaines analyses pourraient contribuer de l'information nouvelle, telle une comparaison entre l'histologie et la chimie des différents types de minéralisation présents chez les espèces actuelles et fossiles ; l'étude de l'évolution des types de minéralisation dans un contexte phylogénétique ; et la vérification si les variations observées entre les différents taxa sont cohérentes selon des contraintes phylogénétiques et/ou fonctionnelles.

Études moléculaires sur la minéralisation des chondrichthyens

Un autre point d'intérêt serait de vérifier si les mêmes gènes sont exprimés dans la formation des différents types de minéralisation (aréolaire, tesserale, continue). Une analyse moléculaire révèle que les gènes associés à l'ossification des ostéichthyens sont aussi présents, en partie, chez *C. milii* (Venkatesh *et al.*, 2014). L'expression génique chez une espèce d'élastombranché devrait aussi être performée, à titre comparatif, vu les différences présentes entre les différents types de minéralisation chez les chondrichthyens, et la présence réduite de la minéralisation chez *C. milii*. Ainsi, ceci pourrait indiquer si l'expression des gènes observés chez *C. milii* est liée à la minéralisation présente chez les chimères ou communes aux chondrichthyens.

5.5.3 Conclusion : vers une synthèse intégrative du développement des chondrichthyens

Une vision intégrative du développement se doit d'intégrer des données morphologiques, moléculaires et paléontologiques afin d'obtenir une vision plus

complète et homogène du développement squelettique (minéralisation) des chondrichthyens, ainsi que de son évolution. Les études proposées plus haut sont dirigées en ce sens. L'ensemble de ces données (progression de la chondrification, minéralisation) permettrait l'élaboration d'une synthèse intégrant l'information morphologique endosquelettique aux stades développementaux externes, afin de mieux comprendre toutes les facettes du développement morphologique. L'analyse d'espèces fossiles et actuelles permettrait une meilleure description des différents types de minéralisation présentes chez les chondrichthyens et une meilleure compréhension de l'évolution des tissus minéralisés chez les gnathostomes.

ANNEXE

Chapter IV Supplementary information:

Appendix 4.1. Supplementary information on the order of ossification of morphological systems in actinopterygians: species, family and bibliographic source.

Ossification of cranial elements before vertebral column:

Centropomus undecimalis, Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993);
Oreochromis mossambicus, Cichlidae (Lau et Shafland, 1982); *Danio rerio*,
 Cyprinidae (Bensimon-Brito *et al.*, 2012 ; Bird et Mabee, 2003 ; Cubbage et
 Mabee, 1996); *Cyprinus carpio*, Cyprinidae (Itazawa, 1963); *Anisotremus*
davidsonii and *Xenistius californiensis*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992);
Salvelinus fontinalis, Salmonidae (Fischer-Rousseau, Cloutier et Zelditch, 2009);
Epinephelus septemfasciatus, Serranidae (Nagano *et al.*, 2007); *Inimicus*
japonicus, Synanceiidae (Imamura et Yabe, 1998).

The cranial and vertebral elements ossify simultaneously:

Belone belone, Belonidae (Kužir *et al.*, 2009); *Sardinops melanosticus*, Clupeidae
 (Matsuoka, 1997); *Normanichthys crockeri*, Normanichthyidae (Velez *et al.*,
 2003).

The centra of the vertebral column mineralizes before the cranium:

Seriola dumerili Carangidae (Liu, 2001).

In branchial arches, ceratobranchials ossify first:

Enchelyurus brunneolus, Blennidae (Watson, 1987); *Centropomus undecimalis*,

Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993); *Sardinops melanosticus*, Clupeidae (Matsuoka, 1997); *Danio rerio*, Cyprinidae (Cubbage et Mabee, 1996); *Anisotremus davidsonii*, Haemulinae (Watson et Walker, 1992); Lutjanidae *Lutjanus campechanus* (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Sparus aurata*, Sparidae (Faustino et Power, 2001).

In the vertebral column, the centra, neural and heamal arches ossify simultaneously:

Carangidae *Seriola dumerili* (Liu, 2001); *Lutjanus campechanus*, Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Pagrus pagrus*, Sparidae (Roo *et al.*, 2010).

The centra ossify before neural and heamal arches:

Cyprinus carpio, Cyprinidae (Itazawa, 1963) ; *Danio rerio*, Cyprinidae (Bensimon-Brito *et al.*, 2012); *Xenistius californiensis*, Haemulidae; *Anisotremus davidsonii*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Lates calcarifer*, Latidae (Fraser, Anderson et de Nys, 2004); *Normanichthys crockeri*, Normanichthyidae (Velez *et al.*, 2003).

The centra ossify after the neural and heamal arches:

Belone belone, Belonidae (Kužir *et al.*, 2009); *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae (Campinho, Moutou et Power, 2004); *Sardinops melanosticus*, Clupeidae (Matsuoka, 1997); *Hippoglossus hippoglossus*, Pleuronectidae (Lewis et Lall, 2006); *Scophthalmus maximus*, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012); *Dentex dentex*, Sparidae (Koumoudouros, Divanach et Kentouri, 2001); *Diplodus sargus*, Sparidae (Koumoudouros *et al.*, 2001); *Pagellus erythrinus*, Sparidae (Sfakianakis *et al.*, 2004).

The centra and neural arches ossify first simultaneously, followed by the heamal arches:

Centropomus undecimalis Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993); *Channa argus*, Channidae (Itazawa, 1963); *Lutjanus campechanus*, Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Epinephelus septemfasciatus*, Serranidae (Nagano *et al.*, 2007); *Inimicus japonicus*, Synanceiidae (Imamura et Yabe, 1998).

Centra ring-shaped calcification:

Sardinops melanosticus, Clupeidae (Matsuoka, 1997); Istiophoridae (Potthoff *et al.*, 1986); *Trichiurus* sp., Trichiuridae (Potthoff *et al.*, 1986).

Centra saddle-shaped calcification:

Enchelyurus brunneolus, Blennidae (Watson, 1987); Gempylidae (Potthoff, Kelley et Javechi, 1986); *Anisotremus davidsonii*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Lutjanus campechanus*, Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Scomber japonicus*, *Scomberomorus* sp., *Sarda sarda*, *Thunnus* spp., Scombridae (Potthoff *et al.*, 1986); *Scombrolabrax heterolepis*, Scombrolabracidae (Potthoff, Kelley et Javechi, 1986); *Scophthalmus maximus*, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012); *Sparus aurata*, Sparidae (Faustino et Power, 1998); Clupeiformes (Richards, Miller et Houde, 1974); Salmoniformes (Potthoff, Kelley et Collins, 1988).

Proximo-distal ossification of neural and heamal arches:

Enchelyurus brunneolus, Blenniidae (Watson, 1987); *Coryphaena hippurus*, Coryphaenidae (Potthoff, 1980); *Engraulis japonicus*, Engraulidae (Balart, 1995); *Anisotremus davidsonii*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Lates calcarifer*, Latidae (Fraser, Anderson et de Nys, 2004); *Lutjanus campechanus*, Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Hippoglossus hippoglossus*, Pleuronectidae (Lewis et Lall, 2006); *Microspathodon chrysurus*, Pomacentridae (Potthoff *et al.*, 1987); *Scomberomorus maculatus*, Scombridae (Potthoff, Kelley et Javechi, 1986);

Thunnus atlanticus, Scombridae (Potthoff, 1975); *Scombrolabrax heterolepis*, Scombrolabracidae (Potthoff, Richards et Ueyanagi, 1980); *Scophthalmus maximus*, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012); *Xiphias gladius*, Xiphiidae (Potthoff et Kelley, 1982).

Ossification of neural and heamal arches from the middle to extremities:

Centropomus undecimalis, Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993); *Sardinops melanostictus*, Clupeidae (Matsuoka, 1997); *Engraulis japonicus*, Engraulidae (Balart, 1995); *Scomber japonicus*, *Sarda sarda*, Scombridae (Potthoff, Kelley et Javechi, 1986); *Sparus aurata*, Sparidae (Faustino et Power, 1998).

Ossification of neural and heamal arches from their extremities toward the middle:

Sebastes schlegeli, Sebastidae (Omori, Sugawara et Honda, 1996).

Pectoral and pelvic fins ossify before dorsal and anal fins:

Microspathodon chrysurus, Pomacentridae (Potthoff *et al.*, 1987).

Pectoral fins ossify first, followed by pelvic fins, and then dorsal and anal fins simultaneously:

Inimicus japonicus, Synanceiidae (Imamura et Yabe, 1998).

Pectoral fins ossify first, followed by dorsal, anal, and pelvic fins:

Anisotremus davidsonii and *Xenistius californiensis*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Dentex dentex*, Sparidae (Koumoudouros, Divanach et Kentouri, 2001).

Pelvic fins ossify first, followed by first dorsal fin and anal fin, second dorsal fin and pectoral fins:

Centropomus undecimalis, Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993).

Pelvic fins ossify first, followed by the dorsal and pectoral fins simultaneously, and then the anal fin:

Seriola dumerili, Carangidae (Liu, 2001).

Pelvic fins and dorsal fin ossify first simultaneously, followed by the anal fin and pectoral fins last:

Lutjanus campechanus Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988).

If only paired fins are compared, pectoral and pelvic fins ossify simultaneously:

Microspathodon chrysurus, Pomacentridae (Potthoff *et al.*, 1987); *Scombrolabrax heterolepis*, Scombrolabracidae (Potthoff, Richards et Ueyanagi, 1980).

Pectoral fins ossify before pelvic fins:

Belone belone, Belonidae (Kužir *et al.*, 2009); *Coryphaena hippurus*, Coryphaenidae (Potthoff, 1980); *D. rerio*, Cyprinidae (Cubbage et Mabee, 1996); *Anisotremus davidsonii*, *Xenistius californiensis* Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Dentex dentex* (Koumoudouros, Divanach et Kentouri, 2001), *Diplodus sargus* (Koumoudouros *et al.*, 2001), *Pagellus erythrinus*, Sparidae (Sfakianakis *et al.*, 2004); *Inimicus japonicus*, Synanceiidae (Imamura et Yabe, 1998).

Pelvic fins ossify before pectoral fins:

Seriola dumerili, Carangidae (Liu, 2001); *Sardinops melanosticus*, Clupeidae (Matsuoka, 1997); *Engraulis japonicus*, Engraulidae (Balart, 1995); *Theragra chalcogramma*, Gadidae (Brown, Busby et Mier, 2001); *Lutjanus campechanus*,

Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988); *Scophthalmus maximus*, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012); *Sebastes schlegeli*, Sebastidae (Omori, Sugawara et Honda, 1996).

The dorsal fin ossify first, followed by the pelvic and anal fins simultaneously, and pectoral fins last:

Sardinops melanosticus, Clupeidae (Matsuoka, 1997).

The dorsal fin ossify first, followed by the anal fin, then the pelvic fins and finally the pectoral fins:

Scophthalmus maximus, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012).

Dorsal and anal fins ossify first, followed by the pectoral and pelvic fins:

Belone belone, Belonidae (Kužir *et al.*, 2009); *Diplodus sargus* (Kourmoudouros *et al.*, 2001); *Pagellus erythrinus*, Sparidae (Sfakianakis *et al.*, 2004).

The dorsal and anal fins initiate ossification simultaneously:

Belone belone, Belonidae (Kužir *et al.*, 2009); *Seriola dumerili*, Carangidae (Liu, 2001); *Coryphaena hippurus*, Coryphaenidae (Potthoff, 1980); *Danio rerio*, Cyprinidae (Bird et Mabee, 2003); *Anisotremus davidsonii*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Microspathodon chrysurus*, Pomacentridae (Potthoff *et al.*, 1987); *Xenistius californiensis*, Haemulidae (Watson et Walker, 1992); *Inimicus japonicus*, Synanceiidae (Imamura et Yabe, 1998).

The dorsal fin ossify before the anal fin:

Scophthalmus maximus, Scophthalmidae (Tong *et al.*, 2012).

The first dorsal fin ossify before the second dorsal and anal fins:

Lutjanus campechanus, Lutjanidae (Potthoff, Kelley et Collins, 1988);

Scombrolabrax heterolepis, Scombrolabracidae (Potthoff, Richards et Ueyanagi, 1980).

The first dorsal and anal fins ossify before the second dorsal fin:

Centropomus undecimalis, Centropomidae (Potthoff et Tellock, 1993).

The first and second dorsal fins and the anal fin ossify simultaneously:

Microspathodon chrysurus, Pomacentridae (Potthoff *et al.*, 1987).

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, A. A. 2011. «Evolution of vertebrate appendicular structures: insight from genetic and palaeontological data». *Developmental Dynamics*, vol. 240, p. 1005-1016.
- Adachi, N., et S. Kuratani. 2012. «Development of head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: I. Embryology and morphology of the head cavities and related structures». *Evolution and Development*, vol. 14, no 3, p. 234–256.
- Amundson, R. 2001. Homology and homoplasy: a philosophical perspective. In *Encyclopedia of Life Science*. New York, John Wiley and Sons, Ltd., p. 1-4.
- Adriaens, D., et W. Verraes. 2002. «An empirical approach to study the relation between ontogeny, size and age using geometric morphometrics». In *Topics in Functional and Ecological Vertebrate Morphology*, P. Aerts, K. D'août, A. Herrel et R. Van Damme, p. 293-324 Shaker Publishing.
- Ahlberg, P. E., et J. A. Clack. 2006. «A firm step from water to land». *Nature*, vol. 440, p. 747-749.
- Ahlstrom, E. H., et R. C. Counts. 1958. «Development and distribution of *Vinciguerria lucetia* and related species in the eastern Pacific». *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service U.S.*, vol. 58, p. 363-416.
- Akimenko, M.-A., S. L. Johnson, M. Westerfield et M. Ekker. 1995. «Differential induction of four msx homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish». *Development*, vol. 121, p. 347-357.
- Allen, C. E. 2008. «The “Eyespot Module” and eyespots as modules: development, evolution, and integration of a complex phenotype». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 310B, p. 179-190.
- Amemiya, C. T., J. Alföldi, A. P. Lee, S. Fan, H. Philippe, I. Maccallum, I. Braasch, T. Manousaki, I. Schneider, N. Rohner, C. Organ, D. Chalopin, J. J. Smith, M. Robinson, R. A. Dorrington, M. Gerdol, B. Aken, M. A. Biscotti, M. Barucca, D. Baurain, A. M. Berlin, G. L. Blatch, F.

- Buonocore, T. Burmester, M. S. Campbell, A. Canapa, J. P. Cannon, A. Christoffels, G. De Moro, A. L. Edkins, L. Fan, A. M. Fausto, N. Feiner, M. Forconi, J. Gamielien, S. Gnerre, A. Gnirke, J. V. Goldstone, W. Haerty, M. E. Hahn, U. Hesse, S. Hoffmann, J. Johnson, S. I. Karchner, S. Kuraku, M. Lara, J. Z. Levin, G. W. Litman, E. Mauceli, T. Miyake, M. G. Mueller, D. R. Nelson, A. Nitsche, E. Olmo, T. Ota, A. Pallavicini, S. Panji, B. Picone, C. P. Ponting, S. J. Prohaska, D. Przybylski, N. R. Saha, V. Ravi, F. J. Ribeiro, T. Sauka-Spengler, G. Scapigliati, S. M. Searle, T. Sharpe, O. Simakov, P. F. Stadler, J. J. Stegeman, K. Sumiyama, D. Tabbaa, H. Tafer, J. Turner-Maier, P. van Heusden, S. White, L. Williams, M. Yandell, H. Brinkmann, J. N. Volff, C. J. Tabin, N. Shubin, M. Scharl, D. B. Jaffe, J. H. Postlethwait, B. Venkatesh, F. Di Palma, E. S. Lander, A. Meyer et K. Lindblad-Toh. 2013. «The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution». *Nature*, vol. 496, p. 311-316.
- Applegate, S. P. 1967. «A survey of shark hard parts». In *Sharks, Skates, and Rays*, P. W. Gilbert, R. F. Mathewson et D. P. Rall, p. 37-67. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Appukuttan, K. K. 1978. «Studies on the developmental stages of hammerhead shark *Sphyrna blochii* from the Gulf of Mannar India». *Indian Journal of Fisheries*, vol. 25, p. 41-51.
- Arratia, G., et H.-P. Schultze. 1990. «The urohyal: Development and homology within osteichthyans». *Journal of Morphology*, vol. 203, p. 247-282.
- Arratia, G., H.-P. Schultze et J. Casciotta. 2001. «Vertebral column and associated elements in dipnoans and comparison with other fishes: Development and homology». *Journal of Morphology*, vol. 250, no 2, p. 101-172.
- Arthur, W. 2003. «Micro-, Macro- and Megaevolution». In *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*, B. K. Hall et W. M. Olsson, p. 249-260. Cambridge: Harvard University Press.
- Aschliman, N. C., K. M. Claeson et J. D. McEachran. 2012. «Phylogeny of Batoidea». In *Biology of Sharks and their Relatives, Edition 2*, J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 57-95. New York: CRC Press.
- Babel, J. S. 1967. «Reproduction, life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper». *Fish Bulletin*, vol. 137, p. 1-80.

- Badyaev, A. V., et K. R. Foresman. 2004. «Evolution of morphological integration. I. Functional units channel stress-induced variation in shrew mandibles». *American Naturalist*, vol. 163, p. 868–879.
- Balart, E. F. 1995. «Development of the vertebral column, fins and fin supports in the japanese anchovy, *Engraulis japonicus* (Clupeiformes: Engraulidae)». *Bulletin of Marine Science*, vol. 56, no 2, p. 495-522.
- Balfour, F. M. 1878. *A Monograph on the Development of Elasmobranch Fishes*. London: MacMillan and Company, 295 p.
- . 1881. «On the development of the skeleton of the paired fins of Elasmobranchii, considered in relation to its bearing on the nature of the limbs of the Vertebrata». *Proceedings of the Zoological Society of London*, vol. 49, no 3, p. 656–670.
- Ballard, W. W., J. Mellinger et H. Lechenault. 1993. «A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula* the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae)». *Journal of Experimental Zoology*, vol. 267, p. 318-336.
- Baranes, A., et J. Wendling. 1981. «The early stages of development in *Carcharhinus plumbeus*». *Journal of Fish Biology*, vol. 18, p. 159-175.
- Bartsch, P., et S. Gemballa. 1992. «On the anatomy and development of the vertebral column and pterygiophores in *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829 (“Pisces”, Polypteriformes)». *Zoologische Jahrbucher*, vol. 122, p. 497–529.
- Baughman, J. L. 1955. «The oviparity of the whale shark, *Rhineodon typus*, with records of this and other fishes in Texas waters». *Copeia*, vol. 1, p. 54-55.
- Beldade, P., et P. M. Brakefield. 2003. «Concerted evolution and developmental integration in modular butterfly wing patterns». *Evolution and Development*, vol. 5, no 2, p. 169–179.
- Bemis, W. E., et P. L. Forey. 2001. «Occipital structure and the posterior limit of the skull in actinopterygians». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution: Palaeontology, Phylogeny, Genetics and Development* P. E. Ahlberg, p. 350-369. London: Taylor and Francis.
- Bensimon-Brito, A., J. Carreira, M. L. Cancela, A. Huysseune et P. E. Witten. 2012. «Distinct patterns of notochord mineralization in zebrafish coincide

- with the localization of Osteocalcin isoform 1 during early vertebral centra formation». *BMC Developmental Biology*, vol. 12, no 28, p. 1-14.
- Benzer, P. 1944. «Morphology of calcification in *Squalus acanthias*». *Copeia*, vol. 1944, no 4, p. 217-224.
- Bininda-Emonds, O. R. P., J. E. Jeffery, M. R. Sánchez-Villagra, J. Hanken, M. W. Colbert, C. Pieau, L. Selwood, C. ten Cate, A. Raynaud, C. K. Osabutey et M. K. Richardson. 2007. «Forelimb-hindlimb developmental timing changes across tetrapod phylogeny». *BMC Evolutionary Biology*, vol. 7, no 182. doi:10.1186/1471-2148-7-182.
- Bird, N. C., et P. M. Mabee. 2003. «Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)». *Developmental Dynamics*, vol. 228, p. 337-357.
- Blomquist, G. E. 2009. «Brief communication: methods of sequence heterochrony for describing modular developmental changes in human evolution». *American Journal of Physical Anthropology*, vol. 138, no 2, p. 231-238.
- Bolker, J. A. 2000. «Modularity in development and why it matters to Evo-Devo». *American Zoologist*, vol. 40, p. 770-776.
- , 2005. «Defining a meeting place: modularity in development and evolution». *Evolution*, vol. 59, no 6, p. 1383-1386.
- , 2014. «Model species in evo-devo: a philosophical perspective». *Evolution and Development*, vol. 16, no 1, p. 49-56.
- Brazeau, M. D. 2009. «The braincase and jaws of a Devonian 'acanthodian' and modern gnathostome origins». *Nature*, vol. 457, p. 305-308.
- Brazeau, M. D. et M. Friedman. 2015. «The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrate». *Nature*, vol. 520, p. 490-497.
- Breuker, C. J., V. Debat et C. P. Klingenberg. 2006. «Functional Evo-Devo». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 21, no 9, p. 488-492.
- Britz, R., et G. D. Johnson. 2010. «Occipito-vertebral fusion in actinopterygians: conjecture, myth and reality. Part 1: non-teleosts». In *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*, J. S. Nelson, H.-P. Schultze et M. V. H. Wilson, p. 77-93. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.

- Brown, A. L., M. S. Busby et K. L. Mier. 2001. «Walleye pollock *Theragra chalcogramma* during transformation from the larval to juvenile stage: otolith and osteological development». *Marine Biology*, vol. 139, p. 845-851.
- Buchholtz, E. A. 2007. «Modular evolution of the cetacean vertebral column». *Evolution and Development*, vol. 9, no 3, p. 278-289.
- Buchholtz, E. A., A. C. Booth et K. E. Webbink. 2007. «Vertebral anatomy in the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*: a developmental and evolutionary analysis». *The Anatomical Record*, vol. 290, no 6, p. 624-637.
- Burke, A. C., C. E. Nelson, B. A. Morgan et C. Tabin. 1995. «Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology». *Development*, vol. 121, no 2, p. 333-346.
- Bustamante, C., J. Lamilla, F. Concha, D. A. Ebert et M. B. Bennett. 2012. «Morphological characters of the thickbody skate *Amblyraja frerichsi* (Kreff 1968)». *PLoS ONE*, vol. 7, no 6, e39963.
- Campbell-Burke, A., et E. Rosa-Molinar. 2002. «Starting from fins: parallelism in the evolution of limbs and genitalia». *Evolution and Development*, vol. 4, no 5, p. 375-377.
- Campinho, M. A., K. A. Moutou et D. M. Power. 2004. «Temperature sensitivity of skeletal ontogeny in *Oreochromis mossambicus*». *Journal of Fish Biology*, vol. 65, no 4, p. 1003-1025.
- Cao, Y., P. J. Waddell, N. Okada et M. Hasegawa. 1998. «The complete mitochondrial DNA sequence of the shark *Mustelus manazo*: evaluating rooting contradictions to living bony vertebrates». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 15, no 12, p. 1637-1646.
- Cappetta, H. 1987. *Chondrichthyes II. Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii*. Coll. «Handbook of Paleoichthyology», H.-P. Schultze, Stuttgart: Gustav Fischer, 193 p.
- Cardeira, J., R. Vallés, G. Dionísio, A. Estévez, E. Gisbert, P. Pousão-Ferreira, M. L. Cancela et P. J. Gavaia. 2012. «Osteology of the axial and appendicular skeletons of the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and early skeletal development at two rearing facilities». *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 28, p. 464-470.

- Castro, J. I., P. M. Bubucis et N. A. Overstrom. 1988. «The reproductive biology of the chain dogfish, *Scyliorhinus retifer*». *Copeia*, vol. 1988, no 3, p. 740-746.
- Charest, F., et R. Cloutier. 2008. «Evolution of median fins modularity in osteichthyans». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 28, p. 63A.
- Chen, M., M. Zou, L. Yang et S. He. 2012. Basal jawed vertebrate phylogenomics using transcriptomic data from Solexa sequencing. *PLoS ONE*, vol. 7, no 4, e36256
- Cheverud, J. M. 1996. «Developmental integration and the evolution of pleiotropy». *American Zoologist*, vol. 36, p. 44-50.
- Claeson, K. M. 2011. «The synarcual cartilage of batoids with emphasis on the synarcual of Rajidae». *Journal of Morphology*, vol. 272, no 12, p. 1444-1463.
- Claeson, K. M., et A. Hilger. 2011. «Morphology of the anterior vertebral region in elasmobranchs: special focus, Squatiniformes». *Fossil Record*, ol. 14, no 2, p. 129-140.
- Clark, R. S. 1927. «Rays and skates. No. 2. Description of embryos». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, vol. 14, p. 661-683.
- Clement, J. G. 1986. «Development, structure and composition of chondrichthyan skeletal tissues». PhD thesis, University of London.
- Cloutier, R. 2010. «The fossil record of fish ontogenies: insights into developmental patterns and processes». *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 21, p. 400-413.
- Cloutier, R., J. Lambrey de Souza, H. I. Browman et A. B. Skiftesvik. 2011. «Early ontogeny of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* head». *Journal of Fish Biology*, vol. 78, p. 1035-1053.
- Cloutier, R., A. Caron, T. Grünbaum et N. R. Le François. 2010. «Effect of water velocity on the timing of skeletogenesis in the arctic charr, *Salvelinus alpinus* (Salmoniformes: Teleostei): an empirical case of developmental plasticity». *International Journal of Zoology*, vol. 2010, no 470546, p. 1-15.

- Cloutier, R., et J. Leblanc. 2006. «Saltatory ontogeny and developmental modularity in the late Devonian osteolepiform *Eusthenopteron foordi*». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 26, no 3, p. 51A.
- Coates, M. I. 1994. «The origin of vertebrate limbs». *Development*, vol. 120 (suppl), p. 169-180.
- . 1995. «Fish fins or tetrapod limbs - a simple twist of fate?». *Current Biology*, vol. 5, no 8, p. 844-848.
- . 2003. «The evolution of paired fins». *Theory in Biosciences*, vol. 122, p. 266-287.
- Coates, M. I., et M. J. Cohn. 1998. «Fins, limbs, and tails: outgrowths and axial patterning in vertebrate evolution». *BioEssays*, vol. 20, p. 371-381.
- . 1999. «Vertebrate axial and appendicular patterning: the early development of paired appendages». *American Zoologist*, vol. 39, p. 676-685.
- Coates, M. I., et M. Ruta. 2007. «Skeletal changes in the transition from fins to limbs». In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, B. K. Hall, p. 15-38. Chicago: University of Chicago Press.
- Coates, M. I., et S. E. K. Sequeira. 1998. «The braincase of a primitive shark». *Transactions of the Royal Society of Edinburgh Earth Science*, vol. 89, p. 63-85.
- . 2001a. «A new stethacanthid chondrichthyan from the Lower Carboniferous of Bearsden, Scotland». *Journal of Vertebrate Paleontology*, , vol. 21, no 3, p. 438-459.
- . 2001b. «Early sharks and primitive gnathostome relationships». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution*, P. E. Ahlberg, p. 241-262. London: Taylor and Francis Inc.
- Coates, M. I., S. E. K. Sequeira, I. J. Sansom et M. M. Smith. 1998. «Spines and tissues of ancient sharks». *Nature*, vol. 396, p. 729-730.
- Cohn, M. J., C. O. Lovejoy, L. Wolpert et M. I. Coates. 2002a. «Branching, segmentation and the metapterygial axis: pattern versus process in the vertebrate limb». *BioEssays*, vol. 24, no 5, p. 460-465.

- Cohn, M. J., C. O. Lovejoy, L. Wolpert et M. I. Coates. 2002b. «Branching, segmentation and the metapterygial axis: pattern versus process in the vertebrate limb». *BioEssays*, vol. 24, p. 460–465.
- Colbert, M. W., et T. Rowe. 2008. «Ontogenetic sequence analysis: using parsimony to characterize developmental sequences and sequence polymorphism». *Journal of Experimental Biology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 310, no 5, p. 398–416.
- Cole, N. J., et P. D. Currie. 2007. «Insights from sharks: Evolutionary and developmental models of fin development». *Developmental Dynamics*, vol. 236, no 9, p. 2421–2431.
- Coles, R. J. 1914. «Notes on the embryos of several species of rays, with remarks on the northward summer migration of certain tropical forms observed on the coast of North Carolina». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 32, p. 29–35.
- Compagno, L. J. V. 1977. «Phyletic relationships of living sharks and rays». *American Zoologist*, vol. 17, no 2, p. 303–322.
- , 1999. «Endoskeleton». In *Sharks, Skates, and Rays: The Biology of Elasmobranch Fishes*, W. C. Hamlett, p. 69–90. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- Compagno, L. J. V., et T. R. Roberts. 1982. «Freshwater stingrays (Dasyatidae) of Southeast Asia and New Guinea, with description of a new species of *Hirnantura* and reports of unidentified species». *Environmental Biology of Fishes*, vol. 7, no 4, p. 321–339.
- Coolen, M., A. Menuet et S. Mazan. 2009. «Towards a synthetic view of axis specification mechanisms in vertebrates: insights from the dogfish». *Comptes Rendus Biologies*, vol. 332, p. 210–218.
- Coolen, M., T. Sauka-Spengler, D. Nicolle, C. Le-Mentec, Y. Lallemand, C. Da Silva, J.-L. Plouhinec, B. Robert, P. Wincker, D.-L. Shi et S. Mazan. 2007. «Evolution of axis specification mechanisms in jawed vertebrates: insights from a chondrichthyan». *PLoS ONE*, vol. 2, no 4 : e374.
- Cote, S., R. Carroll, R. Cloutier et L. Bar-Sagi. 2002. «Vertebral development in the devonian sarcopterygian fish *Eusthenopteron foordi* and the polarity of

- vertebral evolution in non-amniote tetrapods ». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 22, no 3, p. 487-502.
- Cotton, J. A., et R. D. M. Page. 2002. «Going nuclear: gene family evolution and vertebrate phylogeny reconciled». *Proceedings of the Royal Society of London B*, vol. 269, p. 1555–1561.
- Cox, D. L., P. Walker et T. J. Koop. 1999. «Predation on eggs of the thorny skate». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 128, p. 380–384.
- Cracraft, J. 2005. «Phylogeny and evo-devo: characters, homology, and the historical analysis of the evolution of development». *Zoology*, vol. 108 p. 345–356.
- Crane, J. M. 1966. «Late Tertiary radiation of viperfishes (Chauliodontidae) based on a comparison of recent and Miocene species». *Los Angeles County Museum of Natural History Contributions in Science*, vol. 115, p. 1–29.
- Crotwell, P. L., et P. M. Mabee. 2007. «Gene expression patterns underlying proximal–distal skeletal segmentation in late-stage zebrafish, *Danio rerio*». *Developmental Dynamics*, vol. 236, p. 3111-3128.
- Cubbage, C. C., et P. M. Mabee. 1996. «Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae)». *Journal of Morphology*, vol. 229, p. 121-160.
- Cuervo, R., R. Hernández-Martínez, J. Chimal-Monroy, H. Merchant-Larios et L. Covarrubiasa. 2012. «Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no 10, p. 3838–3843.
- D'Souza, D. G., K. Rana, K. M. Milley, H. E. MacLean, J. D. Zajac, J. Bell, S. Brenner, B. Venkatesh, S. J. Richardson et J. A. Danks. 2013. «Expression of Wnt signaling skeletal development genes in the cartilaginous fish, elephant shark (*Callorhynchus milii*)». *Gene and Comparative Endocrinology*, vol. 193, p. 1-9.
- Dahn, R. D., M. C. Davis, W. N. Pappano et N. H. Shubin. 2007. «Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning». *Nature*, vol. 445, p. 311-314.

- Daniel, J. F. 1914. The anatomy of *Heterodontus francisci* II. The endoskeleton. Coll. «University of California Publications in Zoology», no 6. Berkeley: University of California Press p. 447-493.
- . 1934. *The Elasmobranch Fishes*. Berkeley: University of California Press, 332 p.
- Darias, M. J., O. Lan Chow Wing, C. Cahu, J. L. Zambonino-Infante et D. Mazurais. 2010. «Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae». *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26, no 2, p. 280-285.
- Davis, M. C., R. D. Dahn et N. H. Shubin. 2007. «An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish». *Nature*, vol. 447, no 7143, p. 473-476.
- Davis, M. C., N. H. Shubin et A. Force. 2004. «Pectoral fin and girdle development in the basal actinopterygians *Polyodon spathula* and *Acipenser transmontanus*». *Journal of Morphology*, vol. 262, no 2, p. 608-628.
- de Beer, G. R. 1924. «Contributions to the study of the development of the head in *Heterodontus*». *Quarterly Journal of Microscopical Science*, vol. 68, p. 39-65.
- . 1937. *The Development of the Vertebrate Skull*. New York: Oxford University Press, 552 pp., 143 pl.
- de Carvalho, M. R. 1996. «Higher-level elasmobranch phylogeny, basal squalians, and paraphyly». In *Interrelationships of Fishes*, M. L. J. Stiassny, L. R. Parenti et G. D. Johnson, p. 35-62. San Diego: Academic Press.
- Dean, B. 1906. «Chimaeroid fishes and their development». *Carnegie Institute Publication*, vol. 32, p. 1-172, Plates 171-111.
- Dean, M. N. 2011. «Cartilaginous fish skeletal tissues». In *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Elsevier Inc., p. 428-433. San Diego Academic Press.
- Dean, M. N., W.-A. Chiou et A. P. Summers. 2005. «Morphology and ultrastructure of prismatic calcified cartilage». *Microscopy and Microanalysis*, vol. 11 (Suppl 2), p. 1196-1197.

- Dean, M. N., D. R. Huber et H. A. Nance. 2006. «Functional morphology of jaw trabeculation in the lesser electric ray *Narcine brasiliensis*, with comments on the evolution of structural support in the Batoidea». *Journal of Morphology*, vol. 267, no 10, p. 1137-1146.
- Dean, M. N., C. G. Mull, S. N. Gorb et A. P. Summers. 2009. «Ontogeny of the tessellated skeleton: insight from the skeletal growth of the round stingray *Urobatis halleri*». *Journal of Anatomy*, vol. 215, p. 227-239.
- Dean, M. N., et A. P. Summers. 2006. «Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes». *Zoology*, vol. 109, no 2, p. 164-168.
- Didier, D. A. 1995. «Phylogenetic systematics of extant chimaeroid fishes (Holocephali, Chimaeroidei)». *Novitates, American Museum of Natural History*, vol. 3119, p. 1-86.
- , 2004. «Phylogeny and classification of extant Holocephali». In *Biology of Sharks and Their Relatives*, J. A. Musick, J. C. Carrier et M. R. Heithaus, p. 115-135. Chicago: CRC Press.
- Didier, D. A., B. J. Stahl et R. Zangerl. 1994. «Development and growth of compound tooth plates in *Callorhinchus milii* (Chondrichthyes, Holocephali)». *Journal of Morphology*, vol. 222, p. 73-89.
- Didier, D. A., E. E. Leclair et D. A. Vanbuskirk. 1998. «Embryonic staging and external features of development of the chimaeroid fish, *Callorhinchus milii* (Holocephali, Callorhinchidae)». *Journal of Morphology*, vol. 236, p. 25-47.
- Dingerkus, G., B. Séret et E. Guilbert. 1991. «Multiple prismatic calcium phosphate layers in the jaws of present-day shark (Chondrichthyes; Selachii)». *Experientia*, vol. 47, p. 38-40.
- Dingerkus, G., et L. D. Uhler. 1977. «Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage». *Biotechnic and Histochemistry*, vol. 52, no 4, p. 229-232.
- Don, E. K., P. D. Currie et N. J. Cole. 2013. «The evolutionary history of the development of the pelvic fin/hindlimb». *Journal of Anatomy*, vol. 222, p. 114-133.

- Donoghue, P. C. J., et M. A. Purnell. 2005. «Genome duplication, extinction and vertebrate evolution». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 20, no 6, p. 312-319.
- Donoghue, P. C. J., et I. J. Sansom. 2002. «Origin and early evolution of vertebrate skeletonization». *Microscopy Research and Technique*, vol. 59, p. 352-372.
- Douady, C. J., M. Dosay, M. S. Shivji et M. J. Stanhope. 2003. «Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 26, no 2, p. 215-221.
- Dunn, J. R. 1983. «The utility of developmental osteology in taxonomic studies of teleost larvae: a review». *National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report NMFS Circular*, vol. 450, p. 1-19.
- Dunn, K. A., et J. F. Morrissey. 1995. «Molecular phylogeny of elasmobranchs». *Copeia*, vol. 1995, no 3, p. 526-531.
- Eames, B. F., N. Allen, J. Young, A. Kaplan, J. A. Helms et R. A. Schneider. 2007. «Skeletogenesis in the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*». *Journal of Anatomy*, vol. 210, p. 542-554.
- Eble, G. J. 2004. «The macroevolution of phenotypic integration». In *The Evolutionary Biology of Complex Phenotypes*, M. Pigliucci et K. Preston, p. 253-273. Oxford: Oxford University Press.
- Edmonds, J. S. , Y. Shibata, R. C. J. Lenanton, N. Caputi et M. Morita. 1996. «Elemental composition of jaw cartilage of gummy shark *Mustelus antarcticus* Günther». *The Science of the Total Environment*, vol. 192, p. 151-161.
- El-Toubi, M. R. 1949. «The development of the chondrocranium of the spiny dogfish, *Acanthias vulgaris* (*Squalus acanthias*). I. Neurocranium, mandibular and hyoid arches». *Journal of Morphology*, vol. 84, no 2, p. 227-279.
- Ereshefsky, M. 2010. «Homology: integrating phylogeny and development». *Biological Theory*, vol. 4, no 3, p. 225-229.

- Faustino, M., et D. M. Power. 1998. «Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex». *Journal of Fish Biology*, vol. 52, no 1, p. 11-22.
- , 2001. «Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish». *Journal of Fish Biology*, vol. 58, no 2, p. 537-572.
- Faustino, M., et D. M. Power. 1999. «Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream». *Journal of Fish Biology*, vol. 54, p. 1094-1110.
- Ferreiro-Galve, S., E. Candal, I. Carrera, R. Anadón et I. Rodríguez-Moldes. 2008. «Early development of GABAergic cells of the retina in sharks: an immunohistochemical study with GABA and GAD antibodies». *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 36, p. 6-16.
- Ferrier, D. E. K. 2004. «Hox Genes: did the vertebrate ancestor have a Hox14?». *Current Biology*, vol. 14, no 5, p. R210-R211.
- Fiaz, A. W., K. M. Léon-Kloosterziel, G. Gort, S. Schulte-Merker, J. L. van Leeuwen, et S. Kranenbarg. 2012. «Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*)». *PLoS ONE*, vol. 7, no 4, e34072
- Fischer-Rousseau, L., R. Cloutier et M. L. Zelditch. 2009. «Morphological integration and developmental progress during fish ontogeny in two contrasting habitats». *Evolution & Development*, vol. 11, no 6, p. 740-753.
- Fraser, M. R., T. A. Anderson et R. de Nys. 2004. «Ontogenic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture». *Aquaculture*, vol. 242, p. 697-711.
- Freitas, R., et M. J. Cohn. 2004. «Analysis of EphA4 in the lesser spotted catshark identifies a primitive gnathostome expression pattern and reveals co-option during evolution of shark-specific morphology». *Development Genes and Evolution*, vol. 214, p. 466-472.
- Freitas, R., G. Zhang et M. J. Cohn. 2006. «Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates». *Nature*, vol. 442, no 31, p. 1033-1037.

- Freitas, R., G. J. Zhang et M. J. Cohn. 2007. «Biphasic hoxd gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain». *PLoS ONE*, vol. 2, no. 8 : e754.
- Fuiman, L. A., K. R. Poling et D. M. Higgs. 1998. «Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes». *Copeia*, vol. 3, p. 602-611.
- Fürbringer, M. 1897. «Ueber die spino-occipitalen Nerven der Selachier und Holocephalen und ihre vergleichende Morphologie». *Festschrift zum siebenzigsten Geburtstage von Carl Gegenbaur am 21*, vol. 3, p. 349-788.
- Gardiner, J. M., R. E. Hueter, K. P. Maruska, J. A. Sisneros, B. M. Casper, D. A. Mann et L. S. Demski. 2012. «Sensory Physiology and Behavior of Elasmobranchs». In *Biology of Sharks and Their Relatives, Second Edition*, J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 349-401. Boca Raton: CRC Press.
- Garman, S. 1913. «The Plagiostomia: sharks, skates, and rays». *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, no. 36, p. 1-528, 77 pl.
- Gass, G. L., et J. A. Bolker. 2003. «Modularity». In *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*, B. K. Hall and W. M. Olsson, p. 260-267. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Gegenbaur, C. 1878. *Elements of Comparative Anatomy*, London: Macmillan, 645 p.
- Gilbert, S. F. 2003. «The morphogenesis of evolutionary developmental biology». *International Journal of Developmental Biology*, vol. 47, p. 467-477.
- Gilbert, S. F., et J. A. Bolker. 2001. «Homologies of process and modular elements of embryonic construction». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 291, p. 1-12.
- Gilbert, S. F., et R. M. Burian. 2003. «Development, evolution and evolutionary developmental biology». In *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*, B. K. Hall et W. M. Olsson, p. 61-68, Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

- Gilbert, S. F., J. M. Opitz et R. A. Raff. 1996. «Resynthesizing evolutionary and developmental biology». *Developmental Biology*, vol. 173, p. 357-372.
- Gillis, J. A., R. D. Dahn et N. H. Shubin. 2009a. «Chondrogenesis and homology of the visceral skeleton in the little skate, *Leucoraja erinacea* (Chondrichthyes: Batoidea)». *Journal of Morphology*, vol. 270, p. 628–643.
- Gillis, J. A., R. D. Dahn et N. H. Shubin. 2009b. «Shared developmental mechanisms pattern the vertebrate gill arch and paired fin skeletons». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no 14, p. 5720-5724.
- Gillis, J. A., K. A. Rawlinson, J. Bell, W. S. Lyon, C. V. H. Bakera et N. H. Shubin. 2011. «Holocephalan embryos provide evidence for gill arch appendage reduction and opercular evolution in cartilaginous fishes». *Proceedings of the Natural Academy of Science*, vol. 108, no 4, p. 1507-1512.
- Gillis, J. A., et N. H. Shubin. 2009. «The evolution of gnathostome development: insight from chondrichthyan embryology». *Genesis*, vol. 47, p. 825–841.
- Gilmore, R. G., J. W. Dodrill et P. A. Linley. 1983. «Reproduction and embryonic development of the sand tiger shark, *Odontaspis taurus* (Rafinesque)». *Fishery Bulletin*, vol. 81, p. 201–225.
- Ginter, M. 2004. «Devonian sharks and the origin of Xenacanthiformes». In *Recent Advances in the Origin and Early Radiation of Vertebrates*, G. Arratia, M. V. H. Wilson et R. Cloutier, p. 473–486. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Ginter, M., et S. Turner. 2010. «The Middle Paleozoic selachian genus *Thrinacodus*». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 30, no 6, p. 1666–1672.
- Glowacki, J., K. A. Cox, J. O'Sullivan, D. Wilkie et L. J. Deftos. 1986. «Osteoclasts can be induced in fish having an acellular bony skeleton». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, p. 4104-4107.
- Gomez, C., et O. Pourquié. 2009. «Developmental control of segment numbers in vertebrates». *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 312B, no 6, p. 533-544.

- Goodrich, E. S. 1906. «Notes on the development, structure, and origin of the median and paired fins of fish». *Quarterly Journal of Microscopical Science*, vol. 50, p. 333-376.
- , 1930. *Studies on the Structure and Development of Vertebrates*. London: Macmillan & Co., 837 p.
- Goswami, A. 2007. «Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals». *Evolution and Development*, vol. 9, no 3, p. 290-298.
- Goswami, A., V. Weisbecker et M. R. Sánchez-Villagra. 2009. «Developmental modularity and the marsupial-placental dichotomy». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 312B, p. 186-195.
- Goujet, D. F. 1984. «Placoderm interrelationships: a new interpretation, with a short review of placoderm classifications». *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, vol. 107, p. 211-243.
- Goujet, D. F. 2001. «Placoderms and basal gnathostome apomorphies». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution: Palaeontology, Phylogeny and Development*, P. E. Ahlberg, p. 209-222. London, UK: Taylor and Francis.
- Grande, L. 2010. «An empirical synthetic pattern study of gars (Lepisosteiformes) and closely related species, based mostly on skeletal anatomy : the resurrection of Holostei». *American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication*, vol. 6, no. 10 (2A), p. 1-871.
- Grandel, H., et S. Schulte-Merker. 1998. «The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)». *Mechanisms of Development*, vol. 79, p. 99-120.
- Gregory, C. A., W. G. Gunn, A. Peister et D. J. Prockop. 2004. «An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction». *Analytical Biochemistry*, vol. 329, no 1, p. 77-84.
- Grogan, E. D., R. Lund et D. A. Didier. 1999. «Description of the chimaerid jaw and its phylogenetic origins». *Journal of Morphology*, vol. 239, p. 45-59.
- Grogan, E. D., et R. Lund. 2000. «*Debeerius ellefseni* (fam. nov., gen. nov., spec. nov.), an autodiastylic chondrichthyan from the Mississippian Bear Gulch Limestone of Montana (USA), the relationships of the Chondrichthyes,

- and comments on gnathostome evolution ». *Journal of Morphology*, vol. 243 no 3, p. 219-245.
- , 2004. «The origin and relationships of early Chondrichthyes». In *Biology of Sharks and Their Relatives*, J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 3-31. Washington, D.C.: CRC Press.
- , 2009. «Two new inioptrygians (Chondrichthyes) from the Mississippian (Serpukhovian) Bear Gulch limestone of Montana with evidence of a new form of chondrichthyan neurocranium». *Acta Zoologica*, vol. 90, no Supplementary 1, p. 134-151.
- , 2011. «Superfoetative viviparity in a Carboniferous chondrichthyan and reproduction in early gnathostomes». *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 161, no 3, p. 587-594.
- Grogan, E. D., R. Lund et M. Fath. 2014. «A new petalodont chondrichthyan from the Bear Gulch Limestone of Montana, USA, with reassessment of *Netsepoye hawesi* and comments on the morphology of holomorphic petalodonts». *Paleontological Journal*, vol. 48, no 9, p. 1003-1014.
- Grogan, E. D., R. Lund et E. Greenfest-Allen. 2012. The origin and relationships of early Chondrichthyes, in *Biology of Sharks and their Relatives*, 2nd ed., J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 3-30. Washington, D.C.: CRC Press.
- Grogan, E. D., et D. T. Yucha. 1999. Endoskeletal mineralization in *Squalus*: types, development and evolutionary implications. *Annual Joint Meeting Abstracts of the American Elasmobranch Society/American Society of Ichthyologists and Herpetologists* (Pennsylvania State University, College Park). 108 p.
- Grünbaum, T., R. Cloutier et P. Dumont. 2003. Congruence between chondrification and ossification sequences during caudal skeleton development: a Moxostomatini case study, H. I. Browman and A. B. Skiftesvik, p. 161-176. *The Big Fish Bang* (Bergen: LFC/Institute of Marine Research).
- Grünbaum, T., R. Cloutier et B. Vincent. 2012. «Dynamic skeletogenesis in fishes: insight of exercise training on developmental plasticity». *Developmental Dynamics*, vol. 241, no 10, p. 1507-1524.

- Gudger, E. W. 1940. «The breeding habits, reproductive organs and external embryonic development of *Chlamydoselachus*, based on notes and drawings by Bashford Dean». In *The Bashford Dean Memorial Volume Archaic Fishes*, E. W. Gudger, p. 523-633. New York: American Museum of Natural History.
- Guinot, G., S. Adnet et H. Cappetta. 2012. «An analytical approach for estimating fossil record and diversification events in sharks, skates and rays». *PLoS ONE*, vol. 7, no 9, p. e44632.
- Gwyn, A. M. 1940. «The development of the vertebral column of the Pacific herring (*Clupea pallasii*)». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 5, p. 11-22.
- Hagadorn, J. W. 2002. «Bear Gulch: an exceptional Upper Carboniferous plattenkalk». In *Exceptional fossil preservation: a unique view on the evolution of marine life*, D. J. Bootjer et R. K. Bambach, p. 167-183. New York: Columbia University Press.
- Hall, B. K. 1975. «Evolutionary consequences of skeletal differentiation». *American Zoologist*, vol. 15, no 2, p. 329-350.
- , 1995a. «Atavisms and atavistic mutations». *Nature Genetics*, vol. 10, p. 126-127.
- , 1995b. «Homology and embryonic development». *Evolutionary Biology*, vol. 28, p. 1-37.
- , 1999. *Evolutionary Developmental Biology*, 2nd. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, xviii, 491p.
- , 2001. «A commentary on evolutionary developmental biology; paradigms, problems and prospects». *American Zoologist*, vol. 41, p. 1049-1051.
- , 2002. «Palaeontology and evolutionary developmental biology: a science of the nineteenth and twenty-first centuries». *Paleontology*, vol. 45, no 4, p. 647-669.
- , 2003a. «Evo-Devo: evolutionary developmental mechanisms». *International Journal of Developmental Biology*, vol. 47, p. 491-495

- , 2003b. «Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution». *Biological Reviews*, vol. 78, p. 409–433.
- , 2005. *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. San Diego, California: Elsevier Academic Press, xxviii, 760 p.
- , 2007. *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*. Chicago: University of Chicago Press, 433 p.
- , 2009. «Embryos in evolution: evo-devo at the Naples Zoological Station in 1874». *Theory in Biosciences*, vol. 128, p. 7–18.
- , 2010. «Charles Darwin, embryology, evolution and skeletal plasticity». *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26, p. 148–151.
- Hall, B. K., et W. M. Olson. 2003. *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 476 p.
- Hall, B. K., R. D. Pearson, G. B. Müller et E. Abouheif. 2004. *Environment, Development, and Evolution: Toward a Synthesis*. Cambridge, Massachusetts; London, England: MIT Press, xxiii, 304 p.
- Hallgrímsson, B., D. E. Lieberman, W. Liu, A. F. Ford-Hutchinson et F. R. Jirik. 2007. «Epigenetic interactions and the structure of phenotypic variation in the cranium». *Evolution and Development*, vol. 9, no 1, p. 76–91.
- Hallgrímsson, B., K. Willmore et B. K. Hall. 2002. «Canalization, developmental stability, and morphological integration in primate limbs». *American Journal of Physical Anthropology Supplement*, vol. 35, p. 131–158.
- Hanken, J., et R. Wassersug. 1981. «The visible skeleton». *Functional Photography*, vol. 16, p. 22–26.
- Hartwell, L. H., J. J. Hopfield, S. Leibler et A. W. Murray. 1999. «From molecular to modular cell biology». *Nature*, vol. 402, p. C47–C52.
- Hawkes, O. A. M. 1906. «The cranial and spinal nerves of *Chlamydoselachus anguineus* (Gar.)». *Proceedings of the Zoological Society of London*, vol. 2, p. 959–991.

- Hedges, S. B. 2001. «Molecular evidence for the early history of living vertebrates». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution: Paleontology, Phylogeny, Genetics and Development*, P. E. Ahlberg, p. 119-134. New York: Taylor and Francis Inc.
- Heinicke, M. P., G. J. P. Naylor et S. B. Hedges. 2009. «Cartilaginous fishes (Chondrichthyes)». In *The Timetree of Life*, S. B. Hedges et S. Kumar, p. 320-327. New York: Oxford University Press.
- Hernandez, L. P., M. J. F. Barresi et S. H. Devoto. 2002. «Functional morphology and developmental biology of zebrafish: reciprocal illumination from an unlikely couple». *Integrative and Comparative Biology*, vol. 42, p. 222-231.
- Hisaw, F. L., et A. Albert. 1947. «Observations on the reproduction of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*». *Biological Bulletin*, vol. 92, p. 187-199.
- Hoegg, S., et A. Meyer. 2005. «Hox clusters as models for vertebrate genome evolution». *Trends in Genetics*, vol. 21, no 8, p. 421-424.
- Hoekstral, H. E., et J. A. Coyne. 2007. «The locus of evolution: evo-devo and the genetics of adaptation». *Evolution*, vol. 61, no 5, p. 995-1016.
- Holmgren, N. 1933. «On the origin of the tetrapod limb ». *Acta Zoologica*, vol. 14, no 2-3, p. 185-295.
- Holmgren, N. 1940. «Studies on the head in fishes. Embryological, morphological, and phylogenetical researches. Part I. Development of the skull in sharks and rays». *Acta Zoologica*, vol. 21, no (1-3), p. 51-267.
- Holst, R. J., et Q. Bone. 1993. «On bipedalism in skates and rays». *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, vol. 339, no 1287, p. 105-108.
- Hopwood, N. 2007. «A history of normal plates, tables and stages in vertebrate embryology». *International Journal of Developmental Biology*, vol. 51, p. 1-26.
- Horton, A. C., N. R. Mahadevan, C. Minguillon, K. Osoegawa, D. S. Rokhsar, I. Ruvinsky, P. J. de Jong, M. P. Logan et J. J. Gibson-Brown. 2008. «Conservation of linkage and evolution of developmental function within the Tbx2/3/4/5 subfamily of T-box genes: implications for the origin of vertebrate limbs». *Development Genes and Evolution*, vol. 218, p. 613-628.

- Houde, E. D., W. J. Richards et V. P. Saksena. 1974. «Description of eggs and larvae of scaled sardine, *Harengula jaguana*». *Fishery Bulletin U.S.*, vol. 72, p. 1106-1122.
- Hussakof, L. 1912. «Note on an embryo of *Pristis cuspidatus*». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 31, no 25, p. 327-330.
- Iber, D., et R. Zeller. 2012. «Making sense—data-based simulations of vertebrate limb development». *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 22, p. 1-8.
- Imamura, H., et M. Yabe. 1998. «Osteological development of the lumpfish *Inimicus japonicus* (Pisces: Synanceiidae)». *Ichthyological Research*, vol. 45, no 1, p. 53-67.
- Inoue, J. G., M. Miya, K. Lam, B.-H. Tay, J. A. Danks, J. Bell, T. I. Walker et B. Venkatesh. 2010. «Evolutionary origin and phylogeny of the modern holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): a mitogenomic perspective». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 27, no 11, p. 2576-2586.
- Itazawa, Y. 1963. «The ossification sequences of the vertebral column in the carp and the snake-head fish». *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, vol. 29, no 7, p. 667-674.
- Janvier, P. 1981. «*Norselaspis glacialis* n.g., n.sp. et les relations phylogénétiques entre les Kiaeraspidiens (Osteostraci) du Dévonien inférieur du Spitsberg». *Palaeovertebrata*, vol. 11, no 2-3, p. 19-131.
- , 1996. *Early Vertebrates*. Oxford: Oxford Science Publication, 393 p.
- , 2007. «Homologies and evolutionary transitions in early vertebrate history». In *Major Transitions in Vertebrate Evolution*, J. S. Anderson et H.-D. Sues, p. 57-121. Indianapolis: Indiana University Press.
- Janvier, P., M. Arsenault et S. Desbiens. 2004. «Calcified cartilage in the paired fins of the osteostracan *Escuminaspis laticeps* (Traquair 1880), from the late Devonian of Miguasha (Québec, Canada), with a consideration of the early evolution of the pectoral fin endoskeleton in vertebrates». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 24, no 4, p. 773-779.

- Jeffery, J. E., O. R. P. Bininda-Emonds, M. I. Coates et M. K. Richardson. 2002. «Analyzing evolutionary patterns in amniote embryonic development». *Evolution and Development*, vol. 4, no 4, p. 292-302.
- Jenner, R. A., et M. A. Wills. 2007. «The choice of model organisms in evo-devo». *Nature Reviews (Genetics)*, vol. 8, no 4, p. 311-319.
- Johanson, Z. 2002. «Vascularization of the osteostracan and antiarch (Placodermi) pectoral fin: similarities, and implications for placoderm relationships». *Lethaia*, vol. 35, p. 169–186.
- , 2010. «Evolution of paired fins and the lateral somitic frontier». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 314B, p. 347-352.
- Johanson, Z., C. Boisvert, A. Maksimenko, P. Currie et K. Trinajstić. 2015. «Development of the synarcual in the elephant sharks (Holocephali; Chondrichthyes): implications for vertebral formation and fusion». *PLOS ONE*, vol. 10, no 9, e0135138.
- Johanson, Z., R. Carr et A. Ritchie. 2010. «Fusion, gene misexpression and homeotic transformations in vertebral development of the gnathostome stem group (Placodermi)». *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 54, p. 71-80.
- Johanson, Z., M. Sutija et J. Joss. 2005. «Regionalization of axial skeleton in the lungfish *Neoceratodus forsteri* (Dipnoi)». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 304B, no 3, p. 229–237.
- Johanson, Z., K. Trinajstić, R. Carr et A. Ritchie. 2013. «Evolution and development of the synarcual in early vertebrates». *Zoomorphology*, vol. 132, no 1, p. 95-110.
- Johnson, G. D., et R. Britz. 2010. «Occipito-vertebral fusion in actinopterygians: conjecture, myth and reality. Part 2: Teleosts». In *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*, J. S. Nelson, H.-P. Schultze et M. V. H. Wilson, p. 95-110. München, Germany: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Jollie, M. 1971. «Some developmental aspects of the head skeleton of the 35-37 mm *Squalus acanthias* fetus». *Journal of Morphology*, vol. 133, p. 17-40.

- Joss, J., et T. Longhurst. 2001. «Lungfish paired fins». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution: Palaeontology, Phylogeny, Genetics and Development* P. E. Ahlberg, p. 370–376. New York: Taylor and Francis.
- Kawasaki, K., T. Suzuki et K. M. Weiss. 2004. «Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol 101, no 31, p. 11356–11361.
- Kemp, N. E., et S. K. Westrin. 1979. «Ultrastructure of calcified cartilage in the endoskeletal tesserae of sharks». *Journal of Morphology*, vol. 160, no 1, p. 75–101.
- Kempster, R. M., N. S. Hart et S. P. Collin. 2013. Survival of the stillest: predator avoidance in shark embryos. *PLoS ONE*, vol. 8, e52551
- Kikugawa, K., K. Katoh, S. Kuraku, H. Sakurai, O. Ishida, N. Iwabe et T. Miyata. 2004. «Basal jawed vertebrate phylogeny inferred from multiple nuclear DNA-coded genes». *BMC Biology*, vol. 2, p. 3.
- Kim, C.-B., C. Amemiya, W. Bailey, K. Kawasaki, J. Mezey, W. Milleri, S. Minoshima, N. Shimizu, G. Wagner et F. Ruddle. 2000. «Hox cluster genomics in the horn shark, *Heterodontus francisci*». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no 4, p. 1655–1660.
- King, B. L., J. A. Gillis, H. R. Carlisle et R. D. Dahn. 2011. «A natural deletion of the HoxC cluster in elasmobranch fishes». *Science*, vol. 334, no 6062, p. 1517.
- Klingenberg, C. P. 2002. «Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms». *Gene*, vol. 287, p. 3–10.
- Klingenberg, C. P., K. Mebus et J.-C. Auffray. 2003. «Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? ». *Evolution and Development*, vol. 5, no 5, p. 522–531
- Klingenberg, C. P., et S. D. Zaklan. 2000. «Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing». *Evolution*, vol. 54, no 4, p. 1273–1285.
- Klug, S., et J. Kriwet. 2010. «Timing of deep-sea adaptation in dogfish sharks: insights from a supertree of extinct and extant taxa». *Zoologica Scripta*, vol. 39, no 4, p. 331–342.

- Klug, S., J. Kriwet, R. Böttcher, G. Schweigert et G. Dietl. 2009. «Skeletal anatomy of the extinct shark *Paraorthacodus jurensis* (Chondrichthyes; Palaeospinacidae), with comments on synechodontiform and palaeospinacid monophyly». *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 157, p. 107–134.
- Koester, D. M., et C. P. Spirito. 2003. «Punting: an unusual mode of locomotion in the little skate, *Leucoraja erinacea* (Chondrichthyes: Rajidae)». *Copeia*, vol. 2003, no 3, p. 553–561.
- Koob, T. J., et J. H. Long. 2000. «The vertebrate body axis: evolution and mechanical function». *American Zoologist*, vol. 40, no 1, p. 1-018.
- Koumoudouros, G., P. Divanach et M. Kentouri. 2001. «Osteological development of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae): dorsal, anal paired fins and squamation». *Marine Biology*, vol. 138, p. 399–406.
- Koumoudouros, G., D. G. Sfakianakis, E. Maingot, P. Divanach et M. Kentouri. 2001. «Osteological development of the vertebral column and the fins in *Diplodus sargus* (Teleostei: Perciformes: Sparidae)». *Marine Biology*, vol. 139, p. 853–862.
- Kuraku, S. 2011. «Hox gene clusters of early vertebrates: do they serve as reliable markers for genome evolution?». *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 9, no 3, p. 97–103.
- Kuratani, S. 2009. «Modularity, comparative embryology and evo-devo: Developmental dissection of evolving body plans». *Developmental Biology*, vol. 332, no 2009, p. 61–69.
- Kužir, S., Z. Kozarić, E. Gjurčević, B. Baždarić et Z. Petrinc. 2009. «Osteological development of the garfish (*Belone belone*) larvae». *Anatomia, Histologia, Embryologia*, vol. 38, p. 351–354.
- Lacquaniti, F., Y. P. Ivanenko, A. d'Avella, K. E. Zelik et M. Zago. 2013. «Evolutionary and developmental modules». *Frontiers in Computational Neuroscience*, vol. 7, no 61, p. 1–6.
- Larsson, T. A., B.-H. Tay, G. Sundström, R. Fredriksson, S. Brenner, D. Larhammar et B. Venkatesh. 2009. «Neuropeptide Y-family peptides and receptors in the elephant shark, *Callorhynchus milii* confirm gene duplications before the gnathostome radiation». *Genomics*, vol. 93, p. 254–260.

- Lau, S. R., et P. L. Shafland. 1982. «Larval development of snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae)». *Copeia*, vol. 3, p. 618-627.
- Lechner, W., E. Heiss, T. Schwaha, M. Glösmann et F. Ladich. 2011. «Ontogenetic development of weberian ossicles and hearing abilities in the african bullhead catfish». *PLoS ONE*, vol. 6, no 4, e18511.
- Leiby, M. M. 1979. «Morphological development of the eel *Myrophis punctatus* (Ophichthidae) from hatching to metamorphosis, with emphasis on the developing head skeleton». *Bulletin of Marine Science*, vol. 29, no 4, p. 509-521.
- Leidner, A., et D. Thies. 1999. «Placoid scales and oral teeth of Late Jurassic elasmobranchs from Europe». In *Mesozoic Fishes 2 - Systematics and Fossil Record*, G. Arratia et H.-P. Schultze, p. 29-40. München F. Pfeil.
- Leonard, J. B. K., A. P. Summers et T. J. Koob. 1999. «Metabolic rate of embryonic little skate, *Raja erinacea* (Chondrichthyes: Batoidea): the cost of active pumping». *Journal of Experimental Zoology*, vol. 283 p. 13-18
- Lewis, L. M., et S. P. Lall. 2006. «Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis». *Aquaculture*, vol. 257, p. 124-135.
- Licht, M., K. Schmuecker, T. Huelsken, R. Hanel, P. Bartsch et M. Paeckert. 2012. «Contribution to the molecular phylogenetic analysis of extant holocephalan fishes (Holocephali, Chimaeriformes)». *Organisms Diversity and Evolution*, vol. 12, no 4, p. 421-432.
- Limura, T., N. Denans et O. Pourquié. 2009. «Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors». *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 88, p. 201-234.
- Liu, C.-H. 2001. «Early osteological development of the yellow tail *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae)». *Zoological Studies*, vol. 40, no 4, p. 289-298.
- Lucifora, L. O., et A. I. Vassallo. 2002. «Walking in skates (Chondrichthyes, Rajidae): anatomy, behaviour and analogies to tetrapod locomotion». *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 77, p. 35-41.

- Luer, C. A., C. J. Walsh, A. B. Bodine et J. T. Wyffels. 2007. «Normal embryonic development in the clearnose skate, *Raja eglanteria*, with experimental observations on artificial insemination». *Environmental Biology of Fishes*, vol. 80 p. 239–255.
- Lund, R. 1977. «*Echinochimaera meltoni* new genus and species (Chimaeriformes), from the Mississippian of Montana». *Annals of Carnegie Museum*, vol. 46, p. 195–221.
- . 1980. «Viviparity and intrauterine feeding in a new holocephalan fish from the Lower Carboniferous of Montana». *Science*, vol. 209, p. 697–9.
- . 1985a. «The morphology of *Falcatus falcatus* (St. John and Worthen), a Mississippian stethacanthid chondrichthyan from the Bear Gulch Limestone of Montana». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 5, no 1, p. 1-19
- . 1985b. «Stethacanthid elasmobranch remains from the Bear Gulch Limestone (Namurian E2b) of Montana». *American Museum Novitates*, vol. 5, no 2828, p. 1-24
- Lund, R., et E. D. Grogan. 1997a. «Relationships of the Chimaeriformes and the basal radiation of the Chondrichthyes». *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 7, p. 65–123.
- . 1997b. «Cochliodonts from the Mississippian Bear Gulch Limestone (Heath Formation; Big Snowy group; Chesterian) of Montana and the relationships of the Holocephali». *Dinofest International Symposium Proceedings*, p. 477–492.
- Lund, R., et C. Poplin. 1999. «Fish diversity of the Bear Gulch Limestone, Namurian, Lower Carboniferous of Montana». *Geobios*, vol. 32, p. 285–295.
- Ma, L.-H., E. Gilland, A. H. Bass et R. Baker. 2010. Ancestry of motor innervation to pectoral fin and forelimb. *Nature Communications*, vol. 1: 49
- Mabee, P. M. 1993. «Phylogenetic interpretation of ontogenetic change: sorting out the actual and artefactual in an empirical case study of centrarchid fishes». *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 107, p. 175–291.

- , 2000. «Developmental data and phylogenetic systematics: evolution of the vertebrate limb». *American Zoologist*, vol. 40, no 5, p. 789-800.
- Mabee, P. M. 2006. «Integrating evolution and development: the need for bioinformatics in Evo-Devo». *BioScience*, vol. 56, no 4, p. 301-309.
- Mabee, P. M., et M. Noordsy. 2004. «Development of the paired fins in the paddlefish, *Polyodon spathula*». *Journal of Morphology*, vol. 261, p. 334-344
- Mabee, P. M., P. L. Crotwell, N. C. Bird et A. C. Burke. 2002. «Evolution of median fin modules in the axial skeleton of fishes». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 294, p. 77-90.
- Mabee, P. M., K. L. Olmstead et C. C. Cabbage. 2000. «An experimental study of intraspecific variation, developmental timing, and heterochrony in fishes». *Evolution*, vol. 54, no 6, p. 2091-2106.
- Mabee, P. M., et T. A. Trendler. 1996. «Development of the cranium and paired fins in *Betta splendens* (Teleostei: Percomorpha): intraspecific variation and interspecific comparisons». *Journal of Morphology*, vol. 227, p. 249-287.
- Macesic, L. J., et S. M. Kajiura. 2010. «Comparative punting kinematics and pelvic fin musculature of benthic batoids». *Journal of Morphology*, vol. 271, p. 1219-1228.
- Magwene, P. M. 2001. «New tools for studying integration and modularity». *Evolution*, vol. 55, p. 1734-1745.
- Maisey, J. G. 1979. «Finspine morphogenesis in squalid and heterodontid sharks». *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 66, no. 2 p. 161-183.
- , 1984. «Chondrichthyan phylogeny: a look at the evidence». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 4, no 3, p. 359-371.
- , 1986. «Heads and tails: a chordate phylogeny». *Cladistics*, vol. 2, no 3, p. 201-236.

- , 2001. «CT-scan reveals new cranial features in Devonian chondrichthyan “*Cladodus*” *wildungensis*». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 21, no 4, p. 807–810.
- , 2004. «Morphology of the braincase in the broadnose sevengill shark *Notorynchus* (Elasmobranchii, Hexanchiformes), based on CT scanning». *American Museum Novitates*, vol. 3429, p. 1–52.
- , 2005. «Braincase of the Upper Devonian shark *Cladodoides wildungensis* (Chondrichthyes, Elasmobranchii), with observations on the braincase in early chondrichthyans». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 288, p. 1–103.
- , 2007. «The braincase in Paleozoic symmoriiform and cladoselachian sharks». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 541, p. 1–122.
- , 2009. «The spine-brush complex in symmoriiform sharks (Chondrichthyes; Symmoriiformes), with comments on dorsal fin modularity». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 29, no 1, p. 14–24.
- , 2012. «What is an ‘elasmobranch’? The impact of palaeontology in understanding elasmobranch phylogeny and evolution». *Journal of Fish Biology*, vol. 80, no 5, p. 918–951.
- , 2013. «The diversity of tessellated calcification in modern and extinct chondrichthyans». *Revue de Paléobiologie*, vol. 32, no 2, p. 355–371.
- Mallo, M., D. M. Wellik et J. Deschamps. 2010. «Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan». *Developmental Biology*, vol. 344, no 1, p. 7–15.
- Martin, A. P., G. J. P. Naylor et S. R. Palumbi. 1992. «Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals». *Nature*, vol. 357, no 6374, p. 153–155.
- Martin, L. K., et G. M. Cailliet. 1988. «Aspects of the reproduction of the bat ray, *Myliobatis californica*, in central California». *Copeia*, vol. 1988, no 3, p. 754–762.
- Matsuoka, M. 1997. «Osteological development in the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*». *Ichthyological Research*, vol. 44, no 3, p. 275–295.

- Matsuura, Y., et K. Suzuki. 2000. «Early development of the flathead, *Percophis brasiliensis* (Teleostei: Percophididae), from southeastern Brazil». *Ichthyological Research*, vol. 47, no 1, p. 81-87.
- Maxwell, E. E., N. B. Fröbisch et A. C. Heppleston. 2008. «Variability and conservation in late chondrichthyan development: ontogeny of the winter skate (*Leucoraja ocellata*)». *The Anatomical Record*, vol. 291, p. 1079–1087.
- Maxwell, E. E., et L. A. B. Wilson. 2013. «Regionalization of the axial skeleton in the ‘ambush predator’ guild – are there developmental rules underlying body shape evolution in ray-finned fishes? ». *BMC Evolutionary Biology*, vol. 13: 265.
- McEachran, J. D., et C. O. Martin. 1978. «Interrelationships and subgeneric classification of *Raja erinacea* and *R. ocellata* based on claspers, neurocrania and pelvic girdles (Pisces: Rajidae)». *Copeia*, vol. 4, p. 593-601.
- McKee, M. D., et A. Nanci. 1995. «Osteopontin and the bone remodeling sequence». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 760, no 1, p. 177-189.
- McPhie, R. P., et S. E. Campana. 2009. «Bomb dating and age determination of skates (family Rajidae) off the eastern coast of Canada». *ICES Journal of Marine Science*, vol. 66, p. 546–560.
- Mehta, T.K., V. Ravi, S. Yamasaki, A. P. Lee, M. M. Lian, B.-H. Tay, S. Tohari, S. Yanai, A. Tay, S. Brenner et B. Venkatesh. 2013. «Evidence for at least six Hox clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*)». *PNAS*, vol 110, no. 40, p. 16044–16049
- Mellinger, J., F. Wriese et M. J. Alluchon-Gerard. 1986. «Developmental biology of an oviparous shark, *Scyliorhinus canicula*». In *Indo-Pacific Fish Biology*, T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi et K. Matsuura, p. 310-332. Tokyo.
- Mercader, N. 2007. «Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development». *Development, Growth and Differentiation*, vol. 49, no 6, p. 421–437.

- Miles, R. S., et G. C. Young. 1977. «Placoderm interrelationships reconsidered in the light of new ptyctodontids from Gogo, Western Australia». In *Problems in Vertebrate Evolution*, S. A. Andrews, R. S. Miles et A. D. Walker, p. 123-198. London: Academic Press.
- Miller, R. F., R. Cloutier et S. Turner. 2003. «The oldest articulated chondrichthyan from the Early Devonian period». *Nature*, vol. 425, p. 501-504.
- Minguillon, C., J. J. Gibson-Brown et M. P. Logan. 2009. «Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no 51, p. 21726–21730.
- Mischler, B. 2003. «Phylogeny». In *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*, B. K. Hall et W. M. Olson, p. 298-308. Cambridge, Massassuchets: Harvard University Press.
- Mitteroecker, P., et F. Bookstein. 2007. «The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration». *Systematic Biology*, vol. 56, no 5, p. 818-836.
- Mivart, S. G. 1879. «Notes on the fins of elasmobranchs, with considerations on the nature and homologies of vertebrate limbs ». *Transactions of the Zoological Society of London*, vol. 10, p. 439–484.
- Miyake, T. 1988. «The systematics of the stingray genus *Urotrygon* with comments on the interrelationships within Urolophidae (Chondrichthyes, Myliobatiformes)». PhD Dissertation, Texas, College Station: Texas A & M University, 491 p.
- Miyake, T., J. D. McEachran, P. J. Walton et B. K. Hall. 1992. «Development and morphology of rostral cartilages in batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea), with comments on homology within vertebrates». *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 46, no 3, p. 259-298.
- Mizuta, S., J.-H. Hwang et R. Yoshinaka. 2003. «Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate (*Raja kenoei*)». *Food Chemistry*, vol. 80, p. 1–7.
- Moczek, A. P. 2008. «On the origins of novelty in development and evolution». *BioEssays*, vol. 30, no 5, p. 432-447.

- Monteiro, A. 2008. «Alternative models for the evolution of eyespots and of serial homology on lepidopteran wings». *BioEssays*, vol. 30, p. 358-366.
- Monteiro, L. R., V. Bonato et S. F. dos Reis. 2005. «Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae)». *Evolution and Development*, vol. 7, no 5, p. 429-439.
- Mook, D. 1977. «Larval and osteological development of the sheephead, *Archosargus probatocephalus* (Pisces: Sparidae)». *Copeia*, vol. 1977, p. 126-133.
- Moreira, R. A., U. L. Gomes et M. R. de Carvalho. 2011. «Morphological description of *Dipturus mennii* (Chondrichthyes: Elasmobranchii: Rajidae) and its differentiation from *Dipturus trachyderma*». *Zoologia*, vol. 28, no 1, p. 97-111.
- Morin-Kensicki, E. M., E. Melancon et J. S. Eisen. 2002. «Segmental relationship between somites and vertebral column in zebrafish». *Development*, vol. 129, no 16, p. 3851-3860.
- Moser, H. G. , et E. H. Ahlstrom. 1970. «Development of lanternfishes (family Myctophidae) in the California Current. Part I, Species with narrow-eyed larvae.». *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History, Science*, vol. 7, p. 1-145.
- Moss, M. L. 1977. «Skeletal tissues in sharks». *American Zoologist*, vol. 17, no 2, p. 335-342.
- Muhammad, H., Y. Rais, N. Miosge et E. M. Ornan. 2012. «The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, p. 2101-2107.
- Müller, G. B. 2007. «Evo-devo: extending the evolutionary synthesis». *Nature Reviews (Genetics)*, vol. 8, no 12, p. 943-949.
- Müller, J., T. M. Scheyer, J. J. Head, P. M. Barrett, I. Werneburg, P. G. P. Ericson, D. Pol et M. R. Sánchez-Villagra. 2010. «Homeotic effects, somitogenesis and the evolution of vertebral numbers in recent and fossil amniotes». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no 5, p. 2118-2123.
- Musick, J. A., et J. K. Ellis. 2005. «Reproductive evolution of chondrichthyans». In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks*,

Batoids, and Chimaeras, Volume 3, W.C. Hamlett, p. 45-79: Science Publishers, Inc.

- Musick, J. A., M. M. Harbin et L. J. V. Compagno. 2004. «Historical zoogeography of the Selachii ». In *Biology of Sharks and their Relatives*, J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 33-78. New York: CRC Press.
- Nagano, N., A. Hozawa, W. Fujiki, T. Yamada, K. Miyaki, Y. Sakakura et A. Hagiwara. 2007. «Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg)». *Aquaculture Research*, vol. 38, p. 121-130.
- Nair, R. V., et K. K. Appukuttan. 1974. «Observations on the developmental stages of the smooth dogfish, *Eridacnis radcliffei* Smith from the Gulf of Mannar». *Indian Journal of Fisheries*, vol. 21, p. 141-151.
- Natanson, L. J., et G. M. Cailliet. 1986. «Reproduction and development of the Pacific angel shark, *Squatina californica*, off Santa Barbara, California». *Copeia*, vol. 1986, no 4, p. 987-994.
- Naylor, G. J. P., J. A. Ryburn, O. Fedrigo et A. Lopez. 2005. «Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs». In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks Batoids and Chimaeras*, W.C. Hamlett, p. 1-25. Enfield, United States of America: Science publishers Inc.
- Naylor, G. J. P., J. N. Caira, K. Jensen, K. A. M. Rosana, W. T. White et P. R. Last. 2012. «A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 367, p. 1-262.
- Nelson, C. 2004. «Selector genes and the genetic control of developmental modules ». In *Modularity in Development and Evolution*, G. Schlosser et G. P. Wagner, p. 17-33. Chicago, Illinois.
- Nishida, K. 1990. «Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei». *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, vol. 37, no 1-2, p. 1-108.
- Norris, H. W. et and S. P. Hugues. 1920. «The cranial, occipital, and anterior spinal nerves of the dogfish, *Squalus acanthias*». *Journal of Comparative Neurology*, vol. 31, no. 5, p. 293-402.

- Notarbartolo-di-Sciara, G., et F. Serena. 1988. «Term embryo of *Mobula mobular* (Bonnaterre, 1788) from the Northern Tyrrhenian sea». *Atti Società Italiana Naturali Museo Civico Storia Naturale Milano*, vol. 129, no 4, p. 396-400.
- Nowroozi, B. N., C. J. Harper, B. De Kegel, D. Adriaens et E. L. Brainerd. 2012. «Regional variation in morphology of vertebral centra and intervertebral joints in striped bass, *Morone saxatilis*». *Journal of Morphology*, vol. 273, no 4, p. 441-452.
- Omori, M., Y. Sugawara et H. Honda. 1996. «Morphogenesis in hatchery-reared larvae of the black rockfish, *Sebastes schlegeli*, and its relationship to the development of swimming and feeding functions». *Ichthyological Research*, vol. 43, no 3, p. 267-282.
- Onimaru, K., E. Shoguchi, S. Kuratani et M. Tanaka. 2011. «Development and evolution of the lateral plate mesoderm: Comparative analysis of *Amphioxus* and lamprey with implications for the acquisition of paired fins». *Developmental Biology*, vol. 359, no 2011, p. 124-136.
- Ørvig, T. 1951. «Histologic studies of placoderms and fossil elasmobranchs. I: The endoskeleton, with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general». *Arkiv für Zoologie*, vol. 2, p. 321-454.
- Ota, K. G., S. Fujimoto, Y. Oishi et S. Kuratani. 2011. «Identification of vertebra-like elements and their possible differentiation from sclerotomes in the hagfish». *Nature Communications*, vol. 2, 373.
- Ouimette, J.-F., M. Lavertu Jolin, A. L. 'honore, A. Gifuni et J. Drouin. 2010. «Divergent transcriptional activities determine limb identity». *Nature Communications*, vol. 1, no 4, p. 35-44.
- Oulion, S., V. Borday-Birraux, M. Debiais-Thibaud, S. Mazan, P. Laurenti et D. Casane. 2011. «Evolution of repeated structures along the body axis of jawed vertebrates, insights from the *Scyliorhinus canicula* Hox code». *Evolution and Development*, vol. 13, no 3, p. 247-259.
- Oulion, S., M. Debiais-Thibaud, Y. d'Aubenton-Carafa, C. Thermes, C. Da Silva, S. Bernard-Samain, F. Gavory, P. Wincker, S. Mazan et D. Casane. 2010. «Evolution of hox gene clusters in gnathostomes: insights from a survey of a shark (*Scyliorhinus canicula*) transcriptome». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 27, no 12, p. 2829-2838.

- Oulion, S., P. Laurenti et D. Casane. 2012. «Organisation des gènes Hox: l'étude de vertébrés non-modèles mène à un nouveau paradigme». *Médecine Sciences*, vol. 28, no 4, p. 350-353.
- Patterson, C. 1965. «Phylogeny of the chimaeroids». *The Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 249, p. 101-219.
- , 1977. «Cartilage bones, dermal bones and membrane bones, or the exoskeleton versus the endoskeleton». In *Problems in Vertebrate Evolution* S. M. Andrews, R. S. Miles et A. D. Walker, p. 77-121. London: Academic Press.
- Pavlov, D. A., et E. Moksness. 1997. «Development of the axial skeleton in wolffish, *Anarhichas lupus* (Pisces, Anarhichadidae), at different temperatures.». *Environmental Biology of Fishes*, vol. 49, p. 401-416.
- Poe, S. 2004. «A test for patterns of modularity in sequences of developmental events». *Evolution*, vol. 58, no 8, p. 1852-1855.
- Polly, P. D., J. J. Head et M. J. Cohn. 2001. «Testing modularity and dissociation: the evolution of regional proportions in snakes». In *Beyond Heterochrony: The Evolution of Development*, M. L. Zelditch, p. 305-335. New York, New York: John Wiley and Sons Inc.
- Porter, M. E., J. L. Beltrán, T. J. Koob et A. P. Summers. 2006. «Material properties and biochemical composition of mineralized vertebral cartilage in seven elasmobranch species (Chondrichthyes)». *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, p. 2920-2928.
- Porter, M. E., T. J. Koob et A. P. Summers. 2007. «The contribution of mineral to the material properties of vertebral cartilage from the smooth-hound shark *Mustelus californicus*». *Journal of Experimental Biology*, vol. 210, p. 3319-3327.
- Potthoff, T. 1975. «Development and structure of the caudal complex, the vertebral column, and the pterygiophores in the blackfin tuna (*Thunnus atlanticus*, Pisces, Scombridae)». *Bulletin of Marine Science*, vol. 25, no 2, p. 205-231.
- , 1980. «Development and structure of fins and fin supports in dolphin fishes *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiselis* (Coryphaenidae)». *Fishery Bulletin*, vol. 78, no 2, p. 277- 312.

- , 1984. «Clearing and staining techniques». In *Ontogeny and systematics of fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Spec. Publ. 1, p. 35-37.
- Potthoff, T., et S. Kelley. 1982. «Development of the vertebral column, fins and fin supports, branchiostegal rays, and squamation in the swordfish, *Xiphias gladius*». *Fish Bulletin*, vol. 80, no 2, p. 161-186.
- Potthoff, T., S. Kelley et L.A. Collins. 1988. «Osteological development of the red snapper, *Lutjanus campechanus* (Lutjanidae)». *Bulletin of Marine Science*, vol. 43, no 1, p. 1-40.
- Potthoff, T., S. Kelley, V. Saksena, M. Moe et F. Young. 1987. «Description of larval and juvenile yellowtail damselfish, *Microspathodon chrysurus*, Pomacentridae, and their osteological development». *Bulletin of Marine Science*, vol. 40, no 2, p. 330-375.
- Potthoff, T., S. Kelley et J. C. Javechi. 1986. «Cartilage and bone development in scombroid fishes». *Fishery Bulletin*, vol. 84, no 3, p. 647-678.
- Potthoff, T., W. J. Richards et S. Ueyanagi. 1980. «Development of *Scombrolabrax heterolepis* (Pisces, Scombrolabracidae) and comments on familial relationships ». *Bulletin of Marine Science*, vol. 30, no 2, p. 329-357.
- Potthoff, T., et J. A. Tellock. 1993. «Osteological development of the snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae)». *Bulletin of Marine Science*, vol. 52, no 2, p. 669-716.
- Powers, T. P., et C. T. Amemiya. 2004. «Evidence for a Hox14 paralog group in vertebrates». *Current Biology*, vol. 14, no 5, p. R183-184.
- Pradel, A. 2010. «Skull and brain anatomy of Late Carboniferous Sibirhynchidae (Chondrichthyes, Iniopterygia) from Kansas and Oklahoma (USA)». *Geodiversitas*, vol. 32, no 4, p. 595-661.
- Pradel, A., D. A. Didier, D. Casane, P. Tafforeau et J. G. Maisey. 2013. «Holocephalan embryo provides new information on the evolution of the glossopharyngeal nerve, metotic fissure and parachordal plate in gnathostomes». *PLoS ONE*, vol. 8, no 6, p. e66988.

- Pradel, A., M. Langer, J. G. Maisey, D. Geffard-Kuriyama, P. Cloetens, P. Janvier et P. Tafforeau. 2009. «Skull and brain of a 300-million-year-old chimaeroid fish revealed by synchrotron holotomography». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no 13, p. 5224–5228.
- Pradel, A., P. Tafforeau et P. Janvier. 2010. «Study of the pectoral girdle and fins of the Late Carboniferous sibirhynchid iniopterygians (Vertebrata, Chondrichthyes, Iniopterygia) from Kansas and Oklahoma (USA) by means of microtomography, with comments on iniopterygian relationships». *Comptes Rendus Palevol*, vol. 9, p. 377–387.
- Pradel, A., P. Tafforeau, J. G. Maisey et P. Janvier. 2011. «A new Paleozoic symmoriiformes (Chondrichthyes) from the Late Carboniferous of Kansas (USA) and cladistic analysis of early chondrichthyans». *PLoS ONE*, vol. 6 no 9 : e24938.
- Prohaska, S. J., C. Fried, C. T. Amemiya, F. G. Ruddle, G. P. Wagner et P. F. Stadler. 2004. «The shark HoxN cluster is homologous to the human HoxD cluster». *Journal of Molecular Evolution*, vol. 58, no 2, p. 212–217.
- Raff, E. C., et R. A. Raff. 2000. «Dissociability, modularity, evolvability». *Evolution and Development*, vol. 2, p. 235–237.
- Raff, R. A. 1996. *The Shape of Life. Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. Chicago: The University of Chicago Press, 520 p.
- , 1999. «Larval homologies and radical evolutionary changes in early development». In *Homology (Novartis Foundation Symposium 222)*, G. R. Bock et G. Cardew, p. 110–124. Chichester: John Wiley and Sons.
- , 2007. «Written in stone: fossils, genes and evo–devo». *Nature Reviews Genetics*, vol. 8, no 12, p. 911–920
- Raff, R. A., et B. J. Sly. 2000. «Modularity and dissociation in the evolution of gene expression territories in development». *Evolution and Development*, vol. 2, no 2, p. 102–113.
- Raff, R. A., A. Wallace, S. B. Carroll, M. I. Coates et G. Wray. 1999. «Chronicling the birth of a discipline». *Evolution and Development*, vol. 1, no 1, p. 1–2.
- Ravi, V., S. Bhatia, P. Gautier, F. Loosli, B.-H. Tay, T. Tay, M. Murdoch, P. Coutinho, V. van Heyningen, B. Brenner, B. Venkatesh et D. A. Kleinjan.

2013. Sequencing of Pax6 loci from the elephant shark reveals a family of Pax6 genes in vertebrate genomes, forged by ancient duplications and divergences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 9, no 1 : e1003177.
- Ravi, V., et B. Venkatesh. 2008. «Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity». *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 18, no 6, p. 544-550.
- Redfern, B. G. , L. D. Wise et S. Spence. 2007. «An alternative alcian blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage». *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive*, vol. 80, no 3, p. 171-176.
- Redies, C., et L. Puelles. 2001. «Modularity in vertebrate brain development and evolution». *BioEssays*, vol. 23, p. 1100-1111.
- Renz, A. J., A. Meyer et S. Kuraku. 2013. «Revealing less derived nature of cartilaginous fish genomes with their evolutionary time scale inferred with nuclear genes». *PLoS ONE*, vol. 8, no 6 : e66400.
- Richards, W. J., R. V. Miller et E. D. Houde. 1974. «Egg and larval development of the Atlantic thread herring, *Opisthonema oglinum*». *Fishery Bulletin US*, vol. 72, p. 1123-1136.
- Richardson, M. K. , J. Hanken, M. L. Gooneratne, C. Pieau, A. Raynaud, L. Selwood et G. M. Wright. 1997. «There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development». *Anatomy and Embryology*, vol. 196, p. 91-106.
- Rieppel, O. 2005. «Modules, kinds, and homology». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 304B, p. 18-27.
- Robert, J. S. 2002. «How developmental is evolutionary developmental biology?». *Biology and Philosophy*, vol. 17, p. 591-611.
- Roberts, W. E., et J. K. Hartsfield. 2004. «Bone development and function: genetic and environmental mechanisms». *Seminars in Orthodontics*, vol. 10, no 2, p. 100-122.
- Robinson-Rechavi, M., B. Boussau et V. Laudet. 2004. «Phylogenetic dating and characterization of gene duplications in vertebrates: the cartilaginous fish reference». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 21, no 3, p. 580-586.

- Rodda, K. R., et R. S. Seymour. 2008. «Functional morphology of embryonic development in the Port Jackson shark *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer)». *Journal of Fish Biology*, vol. 72, p. 961–984.
- Rodriguez-Moldes, I., I. Carrera, S. Pose-Mendez, I. Quintana-Urzaínqui, E. Candal, R. Anadón, S. Mazan et S. Ferreira-Galve. 2011. «Regionalization of the shark hindbrain: a survey of an ancestral organization». *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 5, no 16, p.
- Roo, F. J., C.-M. Hernández-Cruz, J.-A. Socorro, H. Fernández-Palacios et M.-S. Izquierdo. 2010. «Occurrence of skeletal deformities and osteological development in red porgy *Pagrus pagrus* larvae cultured under different rearing techniques». *Journal of Fish Biology*, vol. 77, p. 1309–1324.
- Rosen, D. E., P. L. Forey, B. G. Gardiner et C. Patterson. 1981. «Lungfishes, tetrapods, paleontology and plesiomorphy». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 167, no 4, p. 159-276.
- Rudel, D., et R. J. Sommer. 2003. «The evolution of developmental mechanisms». *Developmental Biology*, vol. 264, no 1, p. 15–37.
- Rutishauser, R., et P. Moline. 2005. «Evo-devo and the search for homology (“sameness”) in biological systems». *Theory in Biosciences*, vol. 124, no 2, p. 213-241.
- Ruvinsky, I., et J. J. Gibson-Brown. 2000. «Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution». *Development*, vol. 127, p. 5233-5244.
- Ryll, B., S. Sanchez, T. Haitina, P. Tafforeau et P. E. Ahlberg. 2014. «The genome of *Callorhinchus* and the fossil record: a new perspective on SSCP gene evolution in gnathostomes». *Evolution and Development*, vol. 16, no 3, p. 123-124.
- Sagai, T., H. Masuya, M. Tamura, K. Shimizu, Y. Yada, S. Wakana, Y. Gondo, T. Noda et T. Shiroishi. 2004. «Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (*Shh*)». *Mammalian Genome*, vol. 15, no 1, p. 23-34.
- Sakamoto, K., K. Onimaru, K. Munakata, N. Suda, M. Tamura, H. Ochi et M. Tanaka. 2009. «Heterochronic shift in Hox-mediated activation of sonic hedgehog leads to morphological changes during fin development». *PLoS ONE*, vol. 4, no 4 : e5121.

- Sallan, L. C. 2012. «Tetrapod-like axial regionalization in an early ray-finned fish». *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 279, no 1741, p. 3264-3271.
- Scammon, R. E. 1911. «Normal plates of the development of *Squalus acanthias*». In *Normentafeln Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*, F. Keibel, p. 1-140. Jena, Germany Gustav Fischer.
- Schaefer, J. T., et A. P. Summers. 2005. «Batoid wing skeletal structure: novel morphologies, mechanical implications, and phylogenetic patterns». *Journal of Morphology*, vol. 264, p. 298-313.
- Schaeffer, B. 1981. «The xenacanth shark neurocranium, with comments on elasmobranch monophyly ». *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 169, p. 1-66.
- Schaeffer, B., et M. Williams. 1977. «Relationships of fossil and living elasmobranchs». *American Zoologist*, vol. 17, no 2, p. 293-302.
- Schauinsland, H. 1903. «Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Wirbeltiere. I. *Sphenodon*, *Callorhynchus*, *Chamaeleo*». *Zoologica*, vol. 16, p. 5-32, plates 58-89.
- Schilling, N. 2011. «Evolution of the axial system in craniates: morphology and function of the perivertebral musculature». *Frontiers in Zoology*, vol. 8, no 4.
- Schlichting, C. D., et M. Pigliucci. 1998. *Phenotypic Evolution; A Reaction Norm Perspective*. Sunderland, United States of America: Sinauer Associates, 387 p.
- Schlosser, G. 2001. «Using heterochrony plots to detect dissociated coevolution of characters». *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, vol. 291, p. 282-304.
- Schlosser, G. 2004. «The role of modules in development and evolution ». In *Modularity in Development and Evolution*, G. Schlosser et G.P. Wagner, p. 521-582. Chicago: The University of Chicago Press.
- Schlosser, G., et D. Thieffry. 2000. «Modularity in development and evolution». *BioEssays*, vol. 22, p. 1043-1045.

- Schoch, R. R. 2006. «Skull ontogeny: developmental patterns of fishes conserved across major tetrapod clades». *Evolution & Development*, vol. 8, no 6, p. 524-536.
- Scholtz, G. 2005. «Homology and ontogeny: pattern and process in comparative developmental biology». *Theory in Biosciences*, vol. 124, p. 121-143.
- Schulmeister, S., et W. C. Wheeler. 2004. «Comparative and phylogenetic analysis of developmental sequences». *Evolution and Development*, vol. 6, no 1, p. 50-57.
- Sfakianakis, D. G., C. K. Doxa, S. Kouttouki, G. Koumoundouros, E. Maingot, P. Divanach et M. Kentouri. 2005. «Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus puntazzo*». *Aquaculture*, vol. 250, p. 36-46.
- Sfakianakis, D. G., G. Koumoundouros, P. Divanach et M. Kentouri. 2004. «Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities». *Aquaculture*, vol. 232, p. 407-424.
- Shubin, N. 1995. «The evolution of paired fins and the origin of the tetrapod limb: phylogenetic and transformational approaches». *Evolutionary Biology*, vol. 28, p. 39-86.
- Shubin, N., C. Tabin et S. Carroll. 1997. «Fossils, genes and the evolution of animal limbs». *Nature*, vol. 388, p. 639-648.
- Shubin, N., et M. C. Davis. 2004. «Modularity in the evolution of vertebrate appendages». In *Modularity in Development and Evolution*, G. Schlosser et G. P. Wagner, p. 429-439. Chicago: University of Chicago Press.
- Shubin, N., C. Tabin et S. Carroll. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*, vol 457, p. 818-823.
- Simpson, M. R., C. M. Miri et L. G. S. Mello (2012). An assessment of thorny skate (*Amblyraja radiata* Donovan, 1808) in NAFO Subdivision 3Ps and Divisions 3LNO. Fisheries and Oceans Canada. St. John's, NL, DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2012/139: 38 p.
- Sivakumar, P., et G. Chandrakasan. 1998. «Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*:

- comparison with shark cartilage collagen». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1381, p. 161–169.
- Smith, B. G. 1942. «The heterodontoid sharks: their natural history and the external development of *Heterodontus japonicus* based on notes and drawings by Bashford Dean». In *The Bashford Dean Memorial Volume: Archaic Fishes*, E. W. Gudger, p. 649–770. New York: American Museum of Natural History.
- Smith, K. K. 2001. «Heterochrony revisited: the evolution of developmental sequences». *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 73, p. 169–186.
- Smith, M. M., et B. K. Hall. 1990. «Development and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues». *Biological Reviews*, vol. 65, no 3, p. 277–373.
- Smith, M. P., P. C. J. Donoghue et I. J. Sansom. 2002. «The spatial and temporal diversification of Early Palaeozoic vertebrates». In *Palaeobiogeography and Biodiversity Change: the Ordovician and Mesozoic-Cenozoic Radiation*, J. A. Crane et A. W. Owen, p. 69–83. London: Geological Society.
- Sommer, R. J. 2009. «The future of evo–devo: model systems and evolutionary theory». *Nature*, vol. 10, p. 416–422.
- Sordino, P., F. van der Hoeven et D. Duboule. 1995. «Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits». *Nature*, vol. 375, p. 678–681.
- Soshnikova, N., R. Dewaele, P. Janvier, R. Krumlauf et D. Duboule. 2013. «Duplications of hox gene clusters and the emergence of vertebrates». *Developmental Biology*, vol. 378, no 2, p. 194–199.
- Stahl, B. J. 1967. «Morphology and relationships of the Holocephali, with special reference to the venous system». *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, vol. 135, p. 141–213.
- , 1980. «Non-autostylic Pennsylvanian iniopterygian fishes». *Palaeontology*, vol. 232, p. 315–324.
- , 1999. «Chondrichthyes III: Holocephali». In *Handbook of Paleoichthyology*, H.-P. Schultze, p. 1–164. New York: Gustav Fischer.

- Stahl, B. J., et S. Chatterjee. 2003. «A Late Cretaceous callorhynchid (Chondrichthyes, Holocephali) from Seymour Island, Antarctica». *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 22, no 4, p. 848-850.
- Stewart, T. A., et M. E. Hale. 2012. «First description of a musculoskeletal linkage in an adipose fin: innovations for active control in a primitively passive appendage». *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, vol. 280, no 1750 : 20122159.
- Stingo, T., et T. Capriglione. 1986. «DNA and chromosomal evolution in cartilaginous fish». In *Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes*, T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi, and K. Matsuura (eds). *Ichthyological Society of Japan*, p. 140-147, Tokyo.
- Stock, D. W. 2001. «The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition». *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 356, p. 1633-1653.
- Strauss, R. E. 1990. «Heterochronic variation in the developmental timing of cranial ossifications in poeciliid fishes (Cyprinodontiformes)». *Evolution*, vol. 44, no 6, p. 1558-1567.
- Sueiro, C., I. Carrera, I. Rodríguez-Moldes, P. Molist et R. Anadón. 2003. «Development of catecholaminergic systems in the spinal cord of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (Elasmobranchs)». *Developmental Brain Research*, vol. 142, p. 141-150.
- Summers, A. P. 2000. «Stiffening the stingray skeleton — an investigation of durophagy in myliobatid stingray (Chondrichthyes, Batoidea, Myliobatidae)». *Journal of Morphology*, vol. 243 (2), p. 113-126.
- Summers, A. P., R. A. Ketcham et T. Rowe. 2004. «Structure and function of the horn shark (*Heterodontus francisci*) cranium through ontogeny: development of a hard prey specialist». *Journal of Morphology*, vol. 260, no 1, p. 1-12.
- Suzuki, T., Y. Haga, T. Takeuchi, S. Uji, H. Hashimoto et T. Kurokawa. 2003. «Differentiation of chondrocytes and scleroblasts during dorsal fin skeletogenesis in flounder larvae». *Development, Growth and Differentiation*, vol. 45, p. 435- 448.

- Swain, D. P., et H. P. Benoît. 2006. «Change in habitat associations and geographic distribution of thorny skate (*Amblyraja radiata*) in the southern Gulf of St Lawrence: density-dependent habitat selection or response to environmental change?». *Fisheries Oceanography*, vol. 15, no 2, p. 166–182.
- Szeto, D. P., C. Rodriguez-Esteban, A. K. Ryan, S. M. O'Connell, F. Liu, C. Kioussi, A. S. Gleiberman, J. C. Izpisua-Belmonte et M. G. Rosenfeld. 1999. «Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development». *Genes and Development*, vol. 13, p. 484–494.
- Tabin, C., et E. Laufer. 1993. «Hox genes and serial homology». *Nature*, vol. 361, p. 692–693.
- Takechi, M., M. Takeuchi, K. G. Ota, O. Nishimura, M. Mochii, K. Itomi, N. Adachi, M. Takahashi, S. Fujimoto, H. Tarui, M. Okabe, S. Aizawa et S. Kuratani. 2011. «Overview of the transcriptome profiles identified in hagfish, shark, and bichir: current issues arising from some nonmodel vertebrate taxa». *Journal of Experimental Biology Part B - Molecular and Developmental Evolution*, vol. 316B, no 7, p. 526–546.
- Takezaki, N., F. Figueroa, Z. Zaleska-Rutczynska et J. Klein. 2003. «Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 20, p. 287–292.
- Tamura, K., R. Kuraishi, D. Saito, H. Masaki, H. Ide et S. Yonei-Tamura. 2001. «Evolutionary aspects of positioning and identification of vertebrate limbs». *Journal of Anatomy*, vol. 199, p. 195–204.
- Tanaka, M., A. Münsterberg, W. G. Anderson, A. R. Prescott, N. Hazon et C. Tickle. 2002. «Fin development in a cartilaginous fish and the origin of vertebrate limbs». *Nature*, vol. 416, p. 527–531.
- Tanaka, M., et K. Onimaru. 2012. «Acquisition of the paired fins: a view from the sequential evolution of the lateral plate mesoderm». *Evolution and Development*, vol. 14, no 5, p. 412–420.
- Tanaka, M., et C. Tickle. 2007. «The development of fins and limbs». In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, B. K. Hall, p. 65–78. Chicago: University of Chicago Press.

- Te Winkel, L. E. 1950. «Notes on ovulation, ova, and early development in the smooth dogfish, *Mustelus canis*». *Biological Bulletin*, vol. 99, no 3, p. 474-486.
- Templeman, W. 1987. «Differences in sexual maturity and related characteristics between populations of thorny skate (*Raja radiata*) in the Northwest Atlantic». *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, vol. 7, p. 155-167.
- ten Broek, C. M. A., A. J. Bakker, I. Varela-Lasheras, M. Bugiani, S. Van Dongen et F. Galis. 2012. «Evo-Devo of the human vertebral column: on homeotic transformations, pathologies and prenatal selection». *Evolutionary Biology*, vol. 39, no 4, p. 456-471.
- Thatcher, J. K. 1877. «Median and paired fins, a contribution to the history of vertebrate limbs». *Transactions - The Connecticut Academy of Arts and Sciences*, vol. 3, p. 281-308.
- Thorogood, P., et P. Ferretti. 1993. «Hox genes, fin folds and symmetry». *Nature*, vol. 364, p. 196.
- Tickle, C. 2002. «Molecular basis of vertebrate limb patterning». *American Journal of Medical Genetics*, vol. 112, p. 250-255.
- Tickle, C. 2003. «Patterning systems—from one end of the limb to the other». *Developmental Cell*, vol. 4, p. 449-458.
- Tong, X. H., Q. H. Liu, S. H. Xu, D. Y. Ma, Z. Z. Xiao, Y. S. Xiao et J. R. Li. 2012. «Skeletal development and abnormalities of the vertebral column and of the fins in hatchery-reared turbot *Scophthalmus maximus*». *Journal of Fish Biology*, vol. 80, p. 486-502.
- Trinajstić, K., C. Boisvert, J. Long, A. Maksimenko et Z. Johanson. 2014. «Pelvic and reproductive structures in placoderms (stem gnathostomes)». *Biological Reviews*. doi: 10.1111/brv.12118
- van Eeden, F. J., M. Granato, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warga et C. Nüsslein-Volhard. 1996. «Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*». *Development*, vol. 123, p. 255-262.

- Velez, J. A. , W. Watson, E. M. Sandknop, W. Arntz et M. Wolff. 2003. «Larval and osteological development of the mote sculpin (*Normanichthys crockeri*) (Pisces:Normanichthyidae) from the Independencia Bight, Pisco, Peru». *Journal of Plankton Research*, vol. 25, no 3, p. 279-290.
- Velhagen, W. A. 1997. «Analyzing developmental sequences using sequence units». *Systematic Biology*, vol. 46, no 1, p. 204-210.
- Venkatesh, B., M. V. Erdmann et S. Brenner. 2001. «Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no 20, p. 11382-11387.
- Venkatesh, B., E. F. Kirkness, Y.-H. Loh, A. L. Halpern, A. P. Lee, J. Johnson, N. Dandona, L. D. Viswanathan, A. Tay et J. C. Venter. 2007. «Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (*Callorhynchus milii* genome». *PLoS Biology*, vol. 5, no 4, p. e101.
- Venkatesh, B., A. P. Lee, V. Ravi, A. K. Maurya, M. M. Lian, J. B. Swann, Y. Ohta, M. F. Flajnik, Y. Sutoh, M. Kasahara, S. Hoon, V. Gangu, S. W. Roy, M. Irimia, V. Korzh, I. Kondrychyn, Z. W. Lim, B.-H. Tay, S. Tohari, K. W. Kong, S. Ho, B. Lorente-Galdos, J. Quilez, T. Marques-Bonet, B. J. Raney, P. W. Ingham, A. Tay, L. W. Hillier, P. Minx, T. Boehm, R. K. Wilson, S. Brenner et W. C. Warren. 2014. «Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution». *Nature*, vol. 505, p. 174-179.
- Vogt, L., M. Nickel, R. A. Jenner et A. R. Deans. 2013. «The need for data standards in zoomorphology». *Journal of Morphology*, vol. 274, no 7, p. 793-808.
- von Bonde, C. 1945a. «Stages in the development of the picked or spiny dogfish, *Squalus Acanthias* Linn.». *The Biological Bulletin*, vol. 88, no 3, p. 220-232.
- von Bonde, C. 1945b. «The external development of the banded dogfish or Pofadderhaai *Haploblepharus edwardsii* (Müller and Henle)». *The Biological Bulletin*, vol. 88, p. 1-11.
- Von Dassow, G., et E. Munro. 1999. «Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for evo-devo». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 285, p. 307-325.

- Wagner, G. P. 1989. «The origin of morphological characters and the biological basis of homology». *Evolution*, vol. 43, no 6, p. 1157-1171.
- , 1996. «Homologues, natural kinds and the evolution of modularity». *American Zoologist*, vol. 36, p. 36-43.
- , 2014. *Homology, Genes, and Evolutionary Innovation*. Princeton: Princeton University Press 496 p.
- Wagner, G. P., et H. C. E. Larsson. 2007. «Fins/Limbs in the study of evolutionary novelties». In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, B. K. Hall, p. 49-61. Chicago: University of Chicago Press.
- Wagner, G. P., M. Pavlicev et J. M. Cheverud. 2007. «The road to modularity». *Nature Reviews (Genetics)*, vol. 8, p. 921-931.
- Walker, J. D., et J. W. Geissman. 2009. «GSA geologic time scale: commentary». *GSA Today*, vol. 19, no 4, p. 60-61.
- Ward, A. B., et E. L. Brainerd. 2007. «Evolution of axial patterning in elongate fishes». *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 90, no 1, p. 97-116.
- Watson, W. 1987. «Larval development of the endemic Hawaiian blennioid, *Enchelyurus brunneolus* (Pisces: Blenniidae: Omobranchini)». *Bulletin of Marine Science*, vol. 41, no 3, p. 856-888.
- Watson, W., et H. J. Jr. Walker. 1992. «Larval development of sargo (*Anisotremus davidsonii*) and salema (*Xenistius californiensis*) (Pisces: Haemulidae) from the Southern California bight ». *Bulletin of Marine Science*, vol. 51, no 3, p. 360-406.
- Weatherbee, S. D., et L. A. Niswander. 2007. «Mechanisms of chondrogenesis and osteogenesis in limbs». In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, B. K. Hall, p. 93-102. Chicago: The University of Chicago Press.
- Weisel, G. 1967. «Early ossification in the skeleton of the sucker (*Catostomus macrocheilus*) and the guppy (*Poecilia reticulata*)». *Journal of Anatomy*, vol. 12, p. 1-18.

- Weiss, K. M. 1990. «Duplication with variation: metameric logic in evolution from genes to morphology». *Yearbook of Physical Anthropology*, ol. 33, p. 1-23.
- Werneburg, I. 2009. «A standard system to study vertebrate embryos». *PLoS ONE*, vol. 4, no 6 : e5887.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford, England: Oxford University Press, 794 p.
- Whiteman, P. 1973. «The quantitative measurement of alcian blue-glycosaminoglycan complexes». *Biochemical Journal*, vol. 131, p. 343-350.
- Wilga, C. A. D., et G. V. Lauder. 2004. «Biomechanics of locomotion in sharks, rays and chimeras». In *Biology of Sharks and their Relatives*, J. C. Carrier, J. A. Musick et M. R. Heithaus, p. 139-164. New York: CRC Press.
- Wilson, M. V. H., T. Märss et G. F. Hanke. 2007. «Paired fins of jawless vertebrates and their homologies across the agnathan-gnathostome transition». In *Major Transitions in Vertebrate Evolution*, H.-D. Sues et J. Anderson, p. 122-149. Bloomington, Indiana: Indiana University Press.
- Winther, R. G. 2001. «Varieties of modules: kinds, levels, origins, and behaviors». *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 291, p. 116-129.
- Wollom, J. 1970. «Morphology and distribution of larvae and early juveniles of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, and Spanish mackerel, *Scomberomorus maculatus* (Pisces; Scombridae); in the western North Atlantic». University of South Florida, 110 p.
- Wourms, J. P. 1977. «Reproduction and development in chondrichthyan fishes». *American Zoologist*, vol. 17, no 2, p. 379-410.
- 1981. «Viviparity: the maternal-fetal relationship in fishes». *American Zoologist*, vol. 21, no 2, p. 473-515.
- 1997. «The rise of fish embryology in the nineteenth century». *American Zoologist*, vol. 37, p. 269-310.

- Wourms, J. P., et L. S. Demski. 1993. «The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future prospects». *Environmental Biology of Fishes*, vol. 38, p. 7-21.
- Wourms, J. P., et G. S. Whitt. 1981. «Future directions of research on the developmental biology of fishes». *American Zoologist*, vol. 21, no 2, p. 597-604.
- Wyffels, J. T. 2009. «Embryonic development of chondrichthyan fishes—a review». In *Development of Non-Teleost Fishes* Y. W. Kunz, C. A. Luer et B. G. Kapoor, p. 1-103. Enfield:Science Publishers inc.
- Yano, T., et K. Tamura. 2013. «The making of differences between fins and limbs». *Journal of Anatomy*, vol. 222, p. 100 - 113.
- Yonei-Tamura, S., G. Abe, Y. Tanaka, H. Anno, M. Noro, H. Ide, H. Aono, R. Kuraishi, N. Osumi, S. Kuratani et K. Tamura. 2008. «Competent stripes for diverse positions of limbs/fins in gnathostome embryos». *Evolution and Development*, vol. 10, no 6, p. 737-745.
- Young, G. C., et Z. Guorui. 1992. «Structure and function of the pectoral joint and operculum in antiarchs, Devonian placoderm fishes». *Palaeontology*, vol. 35, p. 443-464.
- Young, G.C. 1982. «Devonian sharks from southeastern Australia and Antarctica». *Paleontology*, vol. 25, p. 817-843.
- . 1986. «The relationships of placoderm fishes». *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 88, p. 1-57
- Young, N. M. , et B. Hallgrímsson. 2005. «Serial homology and the evolution of mammalian limb covariation structure». *Evolution*, vol. 59, no 12, p. 2691-2704.
- Yu, W.-P. , V. Rajasegaran, K. Yew, W.-I. Loh, B.-H. Tay, C. T. Amemiya, S. Brenner et B. Venkatesh. 2008. «Elephant shark sequence reveals unique insights into the evolutionary history of vertebrate genes: a comparative analysis of the protocadherin cluster ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no 10, p. 3819-3824.
- Yucha, D. T. 1998. «A qualitative histological analysis of calcified cartilage in *Squalus acanthias*». Philadelphia, Saint Joseph's University, 49 p.

- Zakany, J., et D. Duboule. 2007. «The role of Hox genes during vertebrate limb development». *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 17, no 4, p. 359-366.
- Zangerl, R. 1979. New Chondrichthyes from the Mazon Creek fauna (Pennsylvanian) of Illinois. In *Mazon Creek Fossils* M. H. Nitecki, p. 449–500. New York: Academic Press.
- 1981. *Chondrichthyes I. Paleozoic Elasmobranchii*. Coll. «Handbook of Paleichthyology », H.-P. Schultze, Stuttgart: Gustav Fischer, 115 p.
- 1997. «*Cervifurca nasuta* n. gen. et sep., an interesting member of the Iniopterygidae (Subterbranchialia, Chondrichthyes) from the Pennsylvanian of Indiana, U.S.A.. » *Fieldiana Geology* vol. 35, p. 1–24.
- Zardoya, R., et A. Meyer. 2001. «Vertebrate phylogeny: limits of inference of mitochondrial genome and nuclear rDNA sequence data due to an adverse phylogenetic signal/noise ratio». In *Major Events in Early Vertebrate Evolution: Paleontology, Phylogeny, Genetics and Development* P. E. Ahlberg, p. 106-118. New York: Taylor and Francis Inc.
- Zhang, G. 2009. «An evo-devo view on the origin of the backbone: evolutionary development of the vertebrae». *Integrative and Comparative Biology*, vol. 49, no 2, p. 178–186.
- Zhang, G., B. F. Eames et M. J. Cohn. 2009. «Evolution of Vertebrate Cartilage Development». *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 86, p. 15-42.
- Zhu, M., et X. Yu. 2009. «Stem sarcopterygians have primitive polybasal fin articulation». *Biological Letters*, vol. 5, p. 372–375.
- Zhu, M., X. Yu, P. E. Ahlberg, B. Choo, J. Lu, T. Qiao, Q. Qu, W. Zhao, L. Jia, H. Blom et Y. Zhu. 2013. «A Silurian placoderm with osteichthyan-like marginal jaw bones». *Nature*, vol. 502, p. 188–193.
- Zhu, M., X. Yu, B. Choo, J. Wang et L. Jia. 2012. «An antiarch placoderm shows that pelvic girdles arose at the root of jawed vertebrates». *Biology Letters*, vol. 8, p. 453–456.
- Zhu, M., W. Zhao, L. Jia, J. Lu, T. Qiao et Q. Qu. 2009. «The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters». *Nature*, vol. 458, p. 469-474.

Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D. et R. J. O'Keefe. 2008.
«Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress».
Journal of Clinical Investigation, vol. 118, no. 2, p. 429-438.